N° D'ORDRE : 108

THESES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE

L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

(Doctorat d'Etat)

PAR

Marcel ROLLAND

PREMIERE THESE

OXYDATION DES RESTES DE TYROSINE DES PROTÉINES PAR LA POLYPHÉNOLOXYDASE

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 30 novembre 1962 devant la Commission d'examen

Examinateurs de la Thèse :

MM. DESNUELLE — *Président*

MONIER — *Assesseurs*

DUSSARDIER

N° D'ORDRE : 108

THESES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE

L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

(Doctorat d'Etat)

PAR

Marcel ROLLAND

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PREMIERE THESE

OXYDATION DES RESTES DE TYROSINE DES PROTÉINES PAR LA POLYPHÉNOLOXYDASE

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 30 novembre 1962 devant la Commission d'examen

Examinateurs de la Thèse :

MM. DESNUELLE — *Président*

MONIER — *Assesseurs*

DUSSARDIER

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547003_0006

TRAVAIL

du Laboratoire de Biochimie Médicale

de la Faculté de Médecine et de Pharmacie

de MARSEILLE

Les clichés correspondant aux figures n^{os} 1, 2, 11 A, 11 B, 13 - 21 *nous ont été aimablement communiqués par Elsevier Publishing Company - Amsterdam.*

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur : M. F. MARTY
Maître de conférences de mathématiques
(14 juin 1940)

Doyens honoraires : MM. MARCHAUD, TRAYNARD, CORROY, CHOUX.

Professeurs honoraires : MM. J. MARCHAUD, E. TRAYNARD, G. PETIT, R. THIRY, J. BOSLER, A. TIAN, L. MARGAILLAN, P. BENOIT, H. CABANNES, P. CHOUX.

Doyen : M. P. ROUARD — *Assesseurs :* MM. A. GUILLEMONAT, J.-M. PERES.

Secrétaire principal : M. C. MOYNAULT.

PROFESSEURS

Géologie	MM. CORROY G.
Agronomie tropicale	CERIGHELLI R.
Mécanique expérimentale des fluides	VALENSI J.
Physique générale	ROUARD P.
Botanique	PRAT H.
Chimie biologique	DESNUELLE P.
Biologie générale	ABELOOS M.
Physique industrielle	MERIGOUX R.
Calcul différentiel et intégral	VINCENSINI P.
Chimie générale	CALVET E.
Astronomie	FEHRENBACH C.
Mécanique de l'atmosphère	FAVRE A.
Chimie industrielle	GUILLEMONAT A
Océanographie biologique	PERES J.-M.
Chimie M.P.C.	CARPENI G.
Physique expérimentale	JAUSSERAN C.
Biologie végétale	MOLINIER R.
Physique M.P.C.	DOUCET Y.
Méthodes mathématiques de la physique	SOURIAU J.-M.
Electronique	COTTON P.
Chimie S.P.C.N.	METZGER J.
Zoologie	TIMON-DAVID J.
Mathématiques	FOURES L.
Physique	MALE D.
Mathématiques appliquées	BODIOU G.
Chimie des corps gras	NAUDET M.
Psycho-physiologie	PAILLARD J.
Chimie systématique	SAVIDAN L.
Physique théorique	KASTLER D.
Physique S.P.C.N.	BOUSQUET P.
Physique P.C.B.	PESTEIL P.
Mécanique rationnelle et appliquée	CASAL P.
Minéralogie	ROYER L.
Géologie appliquée	GOUVERNET C.
Physique théorique	VISCONTI A.
Mathématiques générales	BLANCHARD A.
Chimie M.P.C.	LEFEBVRE J.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mécanique des fluides	Mlle CLARION C.
Biologie animale S.P.C.N.	MM. AMAR R.
Chimie théorique	JULG A.
Mathématiques générales (Institut de Nice)	WACHS S.
Physiologie animale	CHOUTEAU J.
Biologie marine	DEVEZE L.
Géologie historique	Mme TAXY S.
Mathématiques M.P.C.	M. BOUGHON P.
Biologie animale S.P.C.N.	Mme FURNESTIN M.-L.
Chimie S.P.C.N.	MM. BERTRAND M.
Physique S.P.C.N.	TROMPETTE J.
Chimie biologique	MONIER R.
Mathématiques	ARAGNOL A.

MAITRES DE CONFERENCES

Chimie M.P.C.	M. LAFFITTE M.
Dynamique des vibrations	SIDERIADES L.
Physique nucléaire	MANDELBROJT J.
Techniques mathématiques de la physique	BOREL F.
Physiologie animale	DUSSARDIER M.
Géologie marine	BLANC J.
Biologie animale	Mlle CHANDEBOIS R.
Biologie animale	MM. BOURDILLON A.
Chimie	GOUZON B.
Physique	PHILIP R.
Physique	BIZOUARD M.
Mathématiques appliquées	GUENOCHE H.
Mathématiques	MOREL H.
Chimie (Nice)	YTHIER C.
Mathématiques (Nice)	Mme BAUDOIN S.
Botanique	MM. RICARD J.
Mathématiques M.P.C.	ZERNER M.

CHARGES DE CONFERENCES

Neurophysiologie	M. MORIN J.
Psycho-physiologie	Mlle GAVINI H.
Physique	MM. JEAN P.
Chimie biologique	SENEZ J.
Mathématiques	Mme COTTON M.
Neurophysiologie	M. GASTAUD H.
Pétrographie	Mlle GUEIRARD S.
Chimie	MM. BEZAGUET A.
Physique (Nice)	COHEN-SOLAL L.
Biologie végétale	MOLINIER R.
Ecologie terrestre et limnique	Mme SCHACHTER D.
Chimie générale	Mlle LAGARDE L.
Géologie	Mlle CATZIGRAS F.
Physique	MM. GARRON R.
Physiologie animale	CASSAND L.
Mathématiques	OTTL G.
Physiologie animale	GARNIER L.
Chimie industrielle	TRAYNARD J.-C.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE MAITRE :

Monsieur le Professeur LISSITZKY

Depuis plusieurs années, nous avons le privilège de travailler à ses côtés, et nous avons pu apprécier sa haute valeur scientifique, son dynamisme, la précision et l'objectivité de ses méthodes de travail.

Nous avons toujours trouvé auprès de lui des conseils éclairés et une aide précieuse pour surmonter des difficultés de tous ordres. Nous le remercions de l'amitié qu'il nous témoigne et de la confiance qu'il nous a accordée, et sommes heureux de lui exprimer ici, avec notre reconnaissance, notre respectueux et sincère attachement.

A NOS JUGES :

Monsieur le Professeur DESNUELLE

Nous apprécions l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de notre thèse.

En témoignage de notre profond respect.

Monsieur le Professeur MONIER

Monsieur le Professeur DUSSARDIER

Nous les remercions de l'accueil qu'ils nous ont réservé et de l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger parmi nos juges.

A Monsieur le Professeur DERRIEN

En témoignage de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur KERTESZ

Avec nos vifs remerciements pour ses utiles suggestions et critiques au cours de ce travail.

A Monsieur le Professeur SOHIER

En témoignage de notre respect et de notre reconnaissance pour l'intérêt qu'il nous a toujours porté.

A Monsieur le DIRECTEUR
DE L'ENSEIGNEMENT MILITAIRE SUPERIEUR
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Avec nos sentiments respectueux et nos remerciements pour les facilités de travail qu'il nous a accordées et l'aide qu'il nous a consentie.

A Madame Simone LASRY

Avec nos remerciements pour sa précieuse collaboration.

A NOS CAMARADES

DES LABORATOIRES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

ET DE BIOCHIMIE MÉDICALE

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE MARSEILLE.

OXYDATION
DES RESTES DE TYROSINE
DES PROTÉINES
PAR LA POLYPHÉNOLOXYDASE

OXYDATION DES RESTES DE TYROSINE DES PROTÉINES PAR LA PLYPHÉNOLOXYDASE

Parmi les enzymes d'oxydo-réduction rencontrés chez les êtres vivants, certains oxydent leurs substrats en leur faisant subir une déshydrogénation couplée avec un transfert de l'hydrogène sur un accepteur intermédiaire, tandis que d'autres catalysent les oxydations de divers composés (dont ces mêmes accepteurs intermédiaires sous forme réduite) aux dépens de l'oxygène moléculaire. Les premiers sont des déshydrogénases anaérobies et les seconds portent le nom d'oxydases.

Il existe en réalité deux grands groupes d'oxydases : les unes catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en eau (système cytochromes-cytochrome oxydase ; acide ascorbique oxydase ; laccase) : ce sont en fait des déshydrogénases aérobies ; les autres réalisent la fixation, sur un substrat, d'oxygène provenant soit de l'air (oxygénases), soit d'eau oxygénée (peroxydases).

Les oxydations catalysées par la polyphénoloxydase, dont certains aspects seront étudiés ici, réunissent, comme nous allons le voir, des réactions appartenant à ces deux catégories d'oxydases : déshydrogénases aérobies et oxygénases. Il nous paraît utile, en effet, avant d'aborder l'exposé de ce travail concernant l'étude de l'oxydation des résidus de tyrosine des protéines par la polyphénoloxydase de champignon, de rappeler brièvement les principales propriétés de l'enzyme utilisé ainsi que quelques-unes des théories ayant trait à son mécanisme d'action.

Bien que mise en évidence depuis la fin du XIX^e^ siècle sous le nom de tyrosinase, la polyphénoloxydase reste un enzyme assez mal connu et dont le mode d'action sur les monophénols est encore discuté. Ceci explique les nombreuses revues consacrées à cet enzyme au cours des dix dernières années (1-9).

I. - PROPRIÉTÉS ET MÉCANISME D'ACTION DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE

La polyphénoloxydase est un métallo-enzyme possédant la propriété de catalyser aux dépens de l'oxygène moléculaire :

1) l'oxydation des orthodihydroxyphénols en orthoquinones,
2) l'hydroxylation de certains monohydroxyphénols en orthodihydroxyphénols.

L'enzyme agit en tant qu'oxygénase seulement dans la deuxième de ces réactions.

Cette différence d'action apparente suivant la nature monophénolique ou orthodiphénolique du substrat, ainsi que la grande variété des phénols oxydés par l'enzyme ont valu à celui-ci de multiples dénominations : tyrosinase, dopa-oxydase, catéchol-oxydase, phénolase, complexe phénolasique. Toutes ces appellations se rapportent très probablement à un enzyme unique ou à des enzymes très voisins, les faibles différences de propriétés observées paraissant en relation avec les modes de préparation et les sources à partir desquelles ils ont été obtenus.

A. - Sources et purification

La polyphénoloxydase a été mise en évidence pour la première fois par G. Bertrand en 1896 chez les végétaux (10). Par la suite, elle a été trouvée chez les bactéries, les invertébrés et les animaux supérieurs. Elle a été isolée et purifiée à partir de diverses sources, initialement par Kubowitz (11) à partir de la pomme de terre, par Keilin et Mann (12) puis Dawson et coll. (13) à partir de champignons cultivés, par Horowitz et coll. (14, 15) à partir de Neurospora Crassa et par Lerner et coll. (16, 1) puis Brown et coll. (17-19) à partir du mélanome de Harding-Passey de la souris. Plus récemment, Kertesz et Zito (20-22, 9) ont obtenu à partir du champignon de Paris *(Psalliota campestris)* une préparation enzymatique très purifiée et de haute activité spécifique.

La purification de l'enzyme se heurte à de nombreuses difficultés parmi lesquelles (9) : 1) sa faible concentration dans le matériel de départ (de l'ordre de 0,004 p. cent en poids dans les cas les plus favorables et 2) la coexistence dans les champignons à la fois de l'enzyme et de certains de ses substrats (phénols végétaux), ayant pour conséquence la formation rapide de produits d'oxydation colorés au cours des premiers stades de la préparation. L'élimination de ces produits, lorsque la purification n'est pas menée convenablement pour éviter leur formation, conduit en général à des pertes importantes en enzyme.

La méthode utilisée par Kertesz et Zito, bien que relativement complexe, a permis à ces auteurs d'obtenir une solution de protéine enzymatique à l'état très pur, homogène à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation. C'est une telle préparation qui a été utilisée au cours de ce travail.

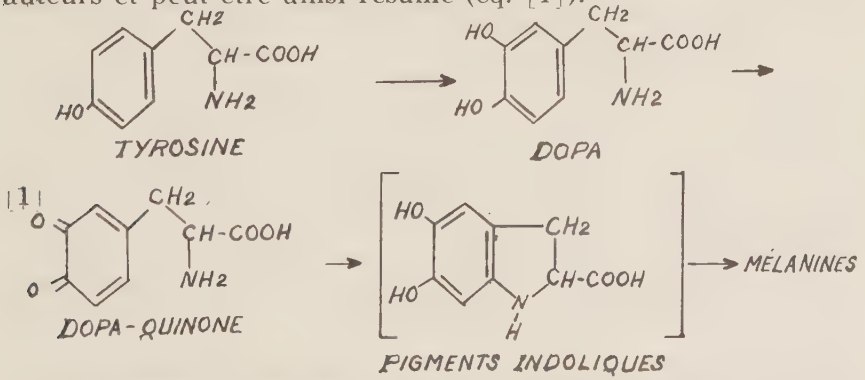
La polyphénoloxydase a un poids moléculaire de l'ordre de 130.000 (9). Elle contient 0,20 p. cent de cuivre, à l'état cuivreux. Le cuivre est lié très fortement à la protéine, mais une dialyse prolongée contre HCN permet la dissociation du métal de l'apoenzyme. L'activité enzymatique est alors totalement perdue, mais elle peut être retrouvée par addition de cuivre.

D'autres propriétés physiques et physico-chimiques de l'enzyme seront précisées au cours du chapitre « Matériel et techniques expérimentales ».

B. - **Produits formés**

Il a déjà été signalé que la polyphénoloxydase est capable de catalyser, à partir de l'oxygène moléculaire, d'une part l'hydroxylation de divers monohydroxyphénols en orthodihydroxyphénols et d'autre part l'oxydation des orthodihydroxyphénols en orthoquinones. Dans les deux cas l'action de l'enzyme sur ses substrats a donc pour résultat leur transformation en orthoquinones. « Les orthoquinones ainsi produites sont des composés instables et très réactifs ; elles donnent lieu à une grande variété de réactions accompagnées en général d'une nouvelle consommation d'oxygène » (9). L'évolution spontanée des orthoquinones produites aboutit presque toujours à la formation de polymères, de structure en général mal définie, appelés mélanines. C'est ainsi que dans le cas de l'oxydation de la tyrosine, un des substrats naturels les plus courants de l'enzyme, l'orthohydroxylation initiale conduit à la formation de dihydroxyphénylalanine (DOPA), oxydée ensuite en DOPA-quinone. Cette dernière, au cours d'une série d'étapes intermédiaires comportant dans un premier temps une cyclisation oxydative de la chaîne latérale, aboutit à la formation de pigments indoliques qui se polymérisent ultérieurement pour donner des mélanines.

Un tel enchaînement de réactions, proposé initialement par Raper (23-26), est admis à l'heure actuelle par la majorité des auteurs et peut être ainsi résumé (éq. [1]).



L'existence, dans les milieux d'oxydation de la tyrosine, des composés formés au cours des étapes intermédiaires à partir de la DOPA-quinone a été largement discutée dans des revues récentes (3, 5, 7, 27) et il semble établi qu'entre la DOPA-quinone et les mélanines toutes les étapes peuvent être gouvernées

uniquement par des mécanismes autocatalytiques (3, 28). La présence de DOPA a été démontrée en utilisant tout d'abord la réaction d'Arnow (26, 29) puis la chromatographie sur papier ; pour la DOPA-quinone, on se heurte à des difficultés tenant à son instabilité (demi-vie : 0,07 sec.) (30) et à sa transformation rapide par des mécanismes non enzymatiques, ce qui rend difficile sa détection, même après inhibition de l'enzyme. Des arguments spectrophotométriques ont cependant été apportés en faveur de la présence de DOPA-quinone dans les milieux d'oxydation de la tyrosine (31) ou de peptides de tyrosine (32) par la polyphénoloxydase.

C. - **Mécanisme d'action**

Le mécanisme d'action de la polyphénoloxydase est en réalité beaucoup plus complexe que ne l'indique le schéma donné précédemment et, bien qu'ayant fait l'objet de nombreuses études, il reste encore controversé. Il doit être envisagé séparément pour les deux types de réactions catalysées par l'enzyme : 1) oxydation des orthodihydroxyphénols et 2) hydroxylation des monohydroxyphénols.

1) Oxydation des orthodihydroxyphénols. — La polyphénoloxydase catalyse l'oxydation des orthodihydroxyphénols en orthoquinones et la réduction simultanée d'oxygène en eau selon l'équation :

$$[2]\quad \text{orthodihydroxyphénol} + 1/2\,O_2 \xrightarrow{\text{polyphénoloxydase}} \text{orthoquinone} + H_2O$$

Dans cette activité, l'enzyme agit comme une oxydase aérobie.

La polyphénoloxydase présente une spécificité étroite malgré le grand nombre de substrats connus. « Tous les composés qui peuvent être considérés comme substrats pour l'activité orthodiphénolasique de l'enzyme doivent avoir au moins deux groupements hydroxyles en position ortho : catéchol, pyrogallol, hydroxyhydroquinone et un nombre énorme de leurs dérivés [liste importante mais incomplète dans (8)] sont tous rapidement oxydés ; mais la résorcine, l'hydroquinone et le phloroglucinol ne le sont pas » (9). Ces faits justifient le nom d'activité catécholasique donné à cette activité de l'enzyme catalysant la réaction [2], le catéchol étant le plus simple des orthodiphénols.

En présence d'agents réducteurs, les orthoquinones formées sont réduites en l'orthodiphénol initial : « elles peuvent ainsi servir d'accepteurs et de transporteurs d'hydrogène pour l'oxydation d'une grande variété de substances » (9) comme par

exemple l'hydroquinone, l'acide ascorbique ou les di- et triphosphopyridine-nucléotides, selon l'équation :

[3] orthoquinone + RH_2 ⟶ orthodihydroxyphénol + R

où RH_2 représente l'agent réducteur et R la forme oxydée de cet agent.

L'addition des équations [2] et [3] aboutit à l'équation [4] :

[4] $$RH_2 + 1/2\ O_2 \rightarrow R + H_2O$$

qui symbolise l'oxydation non spécifique d'un certain nombre de composés réducteurs par le système orthodihydroxyphénol-polyphénoloxydase-oxygène.

Une telle oxydation indirecte d'agents réducteurs a été largement étudiée et a servi de base à la plupart des méthodes de détermination de l'activité catécholasique de l'enzyme (11, 33-37).

2) Oxydation des monophénols. — Le second type d'action catalysée par la polyphénoloxydase est la fixation d'un deuxième groupement hydroxyle sur divers monophénols, en position ortho par rapport au groupement préexistant. Dans cette activité, appelée activité crésolasique, l'enzyme agit comme une oxygénase. Cette réaction paraît beaucoup moins simple que celle précédemment étudiée et certains de ses caractères, tout à fait particuliers, ont depuis longtemps donné lieu à des controverses. Ces « caractéristiques singulières » ont été récemment résumées par Kertesz et Zito (9). Elles sont de trois ordres : 1) l'oxydation des monohydroxyphénols est en général précédée d'une période d'induction dont la durée augmente avec le degré de purification de l'enzyme. Cette période d'induction (qui peut atteindre plusieurs minutes pour les enzymes d'origine végétale et même plusieurs heures pour les enzymes d'origine animale) est anormalement longue lorsqu'on la compare à la durée des périodes d'induction rencontrées habituellement dans les réactions enzymatiques ; 2) la période d'induction peut être raccourcie ou même supprimée par addition d'une petite quantité d'un orthodihydroxyphénol mais, dans ce cas, la vitesse d'oxydation devient apparemment linéaire et est indépendante de la quantité d'orthodihydroxyphénol ajoutée, et 3) la polyphénoloxydase oxyde plus rapidement les orthodihydroxyphénols que les monohydroxyphénols correspondants ; néanmoins il existe toujours dans le milieu d'oxydation d'un monohydroxyphénol une certaine quantité d'orthodihydroxyphénol, à un taux constant (29).

Deux théories principales ont été proposées pour expliquer le mécanisme de l'hydroxylation des monohydroxyphénols, en tenant compte des observations rapportées ci-dessus.

Selon la première, admise par la majorité des auteurs, la polyphénoloxydase serait capable d'une action directe sur les monohydroxyphénols (oxydation enzymatique directe), selon l'équation [5] :

[5] Monohydroxyphénol + 1/2 O_2 → orthodihydroxyphénol

cette action pouvant être initiée ou activée par divers agents réducteurs.

Par contre, pour Onslow et Robinson (38) et surtout pour Kertesz (28, 29, 39, 40) l'orthodihydroxyphénol serait seul substrat de l'enzyme, l'orthoquinone formée étant l'agent de l'hydroxylation non enzymatique du monohydroxyphénol (oxydation non enzymatique indirecte) selon l'équation :

[6] orthoquinone + monohydroxyphénol + H_2O → 2 orthodihydroxyphénols

Un tel mécanisme d'action implique que, selon cette dernière théorie dite « théorie de l'orthoquinone », l'enzyme n'aurait aucun contact direct avec le monohydroxyphénol. Il justifierait le nom de polyphénoloxydase de préférence à celui de tyrosinase ou phénolase, mais pose le problème de la formation initiale des premières molécules d'orthodihydroxyphénol qui, oxydées par l'enzyme en orthoquinone, serviront à amorcer la réaction non enzymatique d'hydroxylation du monohydroxyphénol. Au cours de la réaction, une partie de l'orthoquinone formée servirait à hydroxyler le monophénol, l'autre partie évoluant vers la formation de pigments.

En faveur de chacune de ces deux théories existent un certain nombre d'arguments que nous nous bornerons à énumérer ici.

L'hypothèse selon laquelle l'enzyme serait par lui-même susceptible de catalyser l'hydroxylation des monohydroxyphénols en orthodihydroxyphénols est étayée par les constatations suivantes, rapportées par Mason (41) : 1° la spécificité de la polyphénoloxydase préparée à partir des tissus des animaux supérieurs (« mammalian tyrosinase ») pour les isomères optiques de la série L ; 2° l'impossibilité de réaliser l'hydroxylation de monohydroxyphénols à partir d'orthoquinones préparées par voie enzymatique ; 3° l'activité crésolasique élevée de l'enzyme en présence d'agents réducteurs, et 4° ainsi qu'il ressort d'expériences effectuées par Mason (42), utilisant l'oxygène lourd ($^{*}O_2$), l'introduction directe de l'oxygène atmosphérique dans la molécule d'orthodihydroxyphénol formé.

Pour Kertesz et Zito (9) ces constatations, et particulièrement les deux premières, ne constituent pas des arguments plus en faveur de la théorie enzymatique directe qu'en faveur de la théorie de l'orthoquinone. En effet, si l'on peut admettre

que l'orthoquinone est capable de provoquer indifféremment l'hydroxylation des deux stéréoisomères optiques du monohydroxyphénol, la stéréospécificité dont fait preuve l'enzyme en faveur de la forme L se manifeste dans la réaction d'oxydation de l'orthodihydroxyphénol. Celui-ci, formé à partir d'une forme D de monohydroxyphénol n'est pas oxydé par l'enzyme et ne peut donc plus conduire à la formation d'orthoquinone, agent d'hydroxylation du monophénol. En ce qui concerne l'inactivité de solutions d'orthoquinones préparées enzymatiquement, il est vraisemblable, étant donné la grande réactivité de ces dernières, qu'aucune des préparations étudiées ait dû contenir des orthoquinones en quantité suffisante pour hydroxyler un monophénol.

Indépendamment de ces observations de caractère négatif, d'autres arguments ont été apportés en faveur de la théorie de l'orthoquinone. La vitesse d'oxydation du dihydroxyphénol étant plus grande que la vitesse d'hydroxylation du monohydroxyphénol, seule la théorie de l'orthoquinone, selon laquelle l'hydroxylation d'une molécule de monohydroxyphénol conduit à la formation de deux molécules d'orthodihydroxyphénol, permet d'expliquer la présence de ce dernier composé dans le milieu d'oxydation d'un monohydroxyphénol par la polyphénoloxydase.

De plus, des expériences réalisées par Kertesz et Azzopardi (43, 9) relatives à l'action de la polyphénoloxydase sur les monophénols en présence d'hydroquinone ne peuvent être interprétées qu'en fonction de l'oxydation non enzymatique indirecte des monohydroxyphénols.

Ces auteurs ont constaté que l'addition d'hydroquinone au milieu d'oxydation d'un monohydroxyphénol (le phénol) par la polyphénoloxydase a pour résultat, lorsque la concentration en phénol est faible et la concentration en hydroquinone élevée, une augmentation très importante de la durée de la période d'induction précédant le début de la consommation d'oxygène. La période d'induction est réduite et la vitesse de l'oxydation accrue si les concentrations en phénol ou en enzyme sont augmentées par rapport à celle de l'hydroquinone. De plus, la période d'induction peut être raccourcie par addition d'un orthodihydroxyphénol, mais la vitesse de l'oxydation après la fin de la période d'induction devient alors indépendante de la quantité d'orthodihydroxyphénol ajoutée.

Tous les caractères de l'oxydation d'un monohydroxyphénol observés en l'absence de réducteur sont reproduits dans ces expériences.

L'hydroquinone n'étant ni un substrat ni un inhibiteur de l'enzyme, cette augmentation de la durée de la période d'induction ne peut être interprétée avec l'hypothèse enzymatique directe de l'oxydation des monophénols. Elle peut l'être par

contre si l'on admet que l'orthoquinone formée par oxydation de traces de catéchol (éq. [7]) provenant de l'auto-oxydation du phénol est, au fur et à mesure de sa formation, réduite en catéchol par l'hydroquinone, selon l'équation [8] et ne peut plus agir pour hydroxyler le phénol selon l'équation [9].

Les équations [7], [8] et [9] dans lesquelles QH_2 et Q représentent respectivement les formes réduites et oxydées de l'hydroquinone, rendent compte du schéma réactionnel selon l'hypothèse non enzymatique indirecte :

$$[7] \quad \text{catéchol} + 1/2\ O_2 \xrightarrow{\text{enzyme}} \text{ortho-quinone} + H_2O$$

$$[8] \quad \text{ortho-quinone} + QH_2 \xrightarrow{K_2} \text{catéchol} + Q$$

$$[9] \quad \text{ortho-quinone} + \text{phénol} + H_2O \xrightarrow{K_3} 2\ \text{catéchol}$$

avec $K_2 > K_3$

Kertesz et Zito (9) ont calculé que trois molécules de catéchol pour 10.000 molécules de phénol sont suffisantes pour initier la réaction et mis l'accent sur ce que « le fait intéressant n'est pas l'auto-oxydabilité bien connue du phénol mais plutôt le degré extraordinairement faible d'auto-oxydation suffisant pour initier l'oxydation indirecte ».

L'hydroquinone joue, dans le système, le rôle d'anti-oxydant en éliminant du milieu l'orthoquinone formée enzymatiquement à partir des traces de catéchol provenant de l'auto-oxydation du phénol. Il y a ainsi compétition entre le phénol et l'hydroquinone pour réduire les traces d'orthoquinone formées. La concentration de l'hydroquinone dans le milieu étant élevée par rapport à celle du phénol, et la vitesse de l'oxydation de l'hydroquinone étant plus grande que la vitesse d'hydroxylation du monophénol par l'orthoquinone, la réaction illustrée par l'équation [9] est totalement inhibée et seule celle décrite par l'équation [8] a lieu. Ainsi s'explique l'augmentation de la durée de la période d'induction, qui se prolonge tant que la concentration en hydroquinone reste suffisante pour maintenir le déplacement de l'équilibre des réactions en faveur de l'oxydation de ce composé. On conçoit dès lors que l'augmentation de la quantité d'enzyme ou de la concentration en phénol, la diminution de la concentration en hydroquinone ou l'addition de catéchol aient pour résultat de réduire la durée de la période d'induction précédant l'oxydation du phénol, puisque tous ces facteurs tendent à accroître la vitesse de disparition de l'hydroquinone initialement présente.

Des expériences analogues mais utilisant la tyrosine et la DOPA au lieu du phénol et du catéchol ont donné des résultats identiques (43, 9).

Il apparaît donc que l'hypothèse enzymatique directe de l'oxydation des monophénols est incapable d'expliquer de manière convaincante l'accumulation des orthodihydroxyphénols et l'action de l'hydroquinone, alors que l'hypothèse non enzymatique indirecte est incapable d'expliquer l'incorporation de $^{18}O_2$ montrée par Mason et coll. (42) et l'effet de réducteurs autres que l'hydroquinone, problème qui va être envisagé maintenant.

La morale donnée par Kertesz à ces divergences est qu'il est très difficile de discuter certains problèmes d'une manière purement qualitative et que la plus grande faute des deux hypothèses est de n'avoir pas encore été formulées quantitativement.

3) Action de la polyphénoloxydase en présence d'autres réducteurs.

a) *Phénomènes observés.*

En présence d'hydroquinone, tout se passe donc comme si l'hydroxylation des monohydroxyphénols procédait selon la théorie de l'orthoquinone. Cependant, en présence d'autres réducteurs tels que l'acide ascorbique ou les phosphopyridine-nucléotides réduits, le mécanisme de l'hydroxylation des monohydroxyphénols par la polyphénoloxydase paraît être différent. Dans ce cas, en effet, le monophénol est oxydé rapidement (mesuré par la consommation d'oxygène) et la période d'induction est si courte qu'elle paraît même totalement supprimée. Avec la théorie de l'orthoquinone, l'oxydation rapide du monohydroxyphénol est difficilement concevable, puisque l'acide ascorbique et les phosphopyridine-nucléotides réduits sont des réducteurs énergiques, capables de réduire l'orthoquinone au fur et à mesure de sa formation. On devrait au contraire observer, comme dans le cas de l'hydroquinone, une augmentation de la durée de la période d'induction.

En présence de réducteurs, deux hypothèses sur le mode d'action de l'enzyme restent possibles : 1) la polyphénoloxydase serait capable d'hydroxyler directement le monohydroxyphénol selon la réaction illustrée par l'équation [5]. Cependant, pour les raisons que l'on vient d'exposer, ce mécanisme paraît difficile à admettre et n'a reçu pour l'instant ni démonstration convaincante ni infirmation ; 2) en présence de réducteurs autres que l'hydroquinone, le mécanisme de l'hydroxylation des monophénols serait totalement différent des deux mécanismes proposés jusqu'ici.

b) *Les systèmes d'hydroxylation non spécifique.*

Or, on connaît un certain nombre d'agents physiques et de systèmes chimiques susceptibles de réaliser l'hydroxylation des monohydroxyphénols, et en particulier de la tyrosine. Parmi

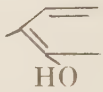
eux les agents physiques, comme les radiations ultraviolettes (44), les rayons X (45) ou les ultra-sons (46) et surtout les systèmes chimiques, tels que le réactif de Fenton (47-50) ou le système ascorbate - ions métalliques (Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{+}, Cu^{2+}) - oxygène moléculaire (50-58) ont été particulièrement bien décrits.

L'étude de ces systèmes modèles peut donner des renseignements sur les mécanismes possibles de l'hydroxylation enzymatique.

α) Le réactif de Fenton, constitué par un mélange de H_2O_2 et de Fe^{2+}, possède des propriétés oxydantes remarquables et peut réaliser l'hydroxylation des monohydroxyphénols en orthodihydroxyphénols. Il a été montré d'une manière concluante que l'oxydation des composés étudiés est le fait de radicaux libres formés aux dépens de l'eau oxygénée (48, 59) selon un mécanisme pouvant être schématisé par la réaction [10] :

[10] $$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\bullet}$$

Le radical libre $HO^{\bullet}$, en présence de Fe^{3+}, pourrait réagir avec un monohydroxyphénol (*) :

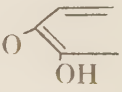
[11] $HO^{\bullet} + Fe^{3+} +$ $\rightarrow H^+ + Fe^{2+} +$ 

β) Une autre réaction (équation [12]) conduisant à la formation du radical libre $HO_2^{\bullet}$ a été suggérée par Massart et Vercauteren (58) sur la base des travaux de Weiss (59).

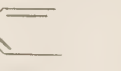
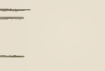
Le fer formerait, avec l'oxygène, un complexe du type ($Fe^{3+}.O_2^{-}$) stabilisé par la présence de différents anions A^- tels que F^-, $P_2O_7^{4-}$, OH^-. Le complexe stabilisé pourrait réagir avec les protons selon :

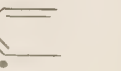
[12] $$(A^-.Fe^{3+}.O_2^{-}) + H^+ \rightarrow (Fe^{3+}.A^-) + HO_2^{\bullet}$$

Le radical $HO_2^{\bullet}$ formé pourrait dès lors hydroxyler un monophénol selon :

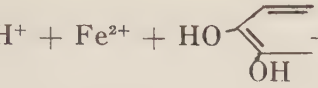
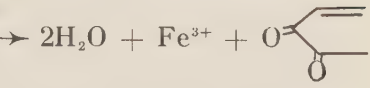
[13] $HO_2^{\bullet} + Fe^{2+} +$ $\rightarrow OH^- + Fe^{3+} +$ 

(*) ... ou, éventuellement, selon (58) :

[11 *bis*] $HO^{\bullet} +$  $\rightarrow H_2O +$ 

$HO^{\bullet} +$  $\rightarrow$

ou, éventuellement, oxyder un orthodihydroxyphénol selon :

[14] $HO_2^{\bullet} + H^+ + Fe^{2+} +$  $\rightarrow 2H_2O + Fe^{3+} +$ 

Dans ces deux systèmes la concentration en radicaux libres, actifs comme agents d'oxydation, est le résultat de la vitesse relative des différentes réactions de compétition tendant à les éliminer du milieu. La structure chimique des composés aromatiques oxydables paraît intervenir d'une manière déterminante dans l'établissement de l'équilibre.

γ) Le rôle de l'acide ascorbique comme agent d'hydroxylation *in vitro* et *in vivo* est bien connu. Udenfriend et coll. (60, 51, 52), étudiant l'hydroxylation de la tyramine par des extraits surrénaux, ont observé l'effet activateur de l'acide ascorbique. L'acide ascorbique + Fe^{2+} (ou Fe^{3+}) + EDTA (et à un moindre degré Cu^+ et Cu^{2+}) peuvent être substitués à l'extrait enzymatique.

En anaérobiose, l'addition de 2 moles de H_2O_2 par mole d'acide ascorbique peut remplacer l'oxygène. D'autres énediols ou d'autres composés dicétoniques tels que l'acide isoascorbique, l'acide dihydroxymalcique, la ninhydrine, l'acide déhydroascorbique ou l'acide dicétogulonique peuvent remplacer l'acide ascorbique. Cependant en aérobiose seuls les énediols sont actifs.

Le système est capable d'hydroxyler non spécifiquement de nombreux monohydroxyphénols (50, 61) en donnant naissance au mélange des ortho- méta- et para-dihydroxyphénols correspondants.

De nombreux travaux (54, 59, 61) ont montré que le radical libre $HO^{\bullet}$ était l'agent oxydant, sa formation dépendant de l'auto-oxydation initiale de l'acide ascorbique selon les éq. [15] et [16] :

[15] $AH_2 + O^2 \rightarrow A + H_2O_2$

[16] $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + HO^{\bullet} + Fe^{3+}$

ou [16 *bis*] $H_2O_2 \longrightarrow 2HO^{\bullet}$

On trouvera dans les articles de Acheson et Hazelwood (61) et de Nofre, Cier et Lefier (57) une discussion détaillée sur ces mécanismes. La démonstration expérimentale directe de la présence de radicaux libres dans le milieu a été apportée par Acheson et Hazelwood (61) qui ont montré que le méthacrylate de méthyle ajouté au milieu est transformé en polyméthacrylate de méthyle, la polymérisation se produisant en présence, mais non en l'absence d'acide ascorbique.

c) *Discussion.*

Quelques auteurs ont essayé de rapprocher les propriétés que semblent posséder en commun le système d'Udenfriend et l'activité monophénolasique de la polyphénoloxydase : l'un et l'autre nécessitent en effet la présence « d'oxygène moléculaire, d'une substance réductrice, d'un enzyme ou d'un agent complexant et d'un ion métallique » (9).

Un argument en faveur de l'analogie des deux systèmes peut être trouvé dans le fait que l'hydroxylation des monohydroxyphénols par la polyphénoloxydase a lieu en présence d'acide ascorbique mais non en présence d'hydroquinone.

De plus, l'accélération de l'oxydation enzymatique des monohydroxyphénols par différents ions métalliques (28) semble en bon accord avec cette possibilité.

En fait, à la lumière de travaux récents (62, 69) il apparaît que les deux systèmes ont des mécanismes d'action voisins mais non identiques.

Le radical libre $HO^{\bullet}$ qui apparaît dans le système d'Udenfriend provient de la scission de H_2O_2 formée par autooxydation de l'acide ascorbique (éq. [15] et [16]) en présence d'ions métalliques complexés.

La présence de H_2O_2 (10^{-4} M) dans le système ascorbate - Fe^{2+} - EDTA - oxygène a été démontrée d'une manière très élégante par Kertesz et Zito (62, 9), en mettant à profit le spectre caractéristique du complexe II de la catalase avec H_2O_2. Ce spectre disparaît par addition d'une petite quantité de monohydroxyphénol au milieu. Ces auteurs ont montré en outre que la catalase, ajoutée au système, inhibe l'hydroxylation de la tyrosine en DOPA. Ceci démontre que la formation de H_2O_2 précède celle du radical libre responsable de l'hydroxylation.

Kertesz et Zito ont également étudié l'oxydation de l'acide ascorbique par le système polyphénoloxydase-catéchol-oxygène en présence de catalase. La quantité de H_2O_2 formée est beaucoup plus faible (environ 10^{-7} M) que dans le système d'Udenfriend et le spectre du complexe avec la catalase (observé au niveau de la bande de Soret) disparaît par addition de monophénol. Mais, contrairement au système non enzymatique, l'addition de catalase n'inhibe pas l'hydroxylation des monohydroxyphénols.

Dans le cas du système enzymatique, H_2O_2 paraît être formée, probablement par une réaction accessoire, en très petite quantité et seulement en l'absence de monohydroxyphénols. L'absence d'effet de la catalase semble indiquer que la formation de l'agent d'hydroxylation précède celle de H_2O_2, cet agent étant lui-même un radical libre participant à sa formation.

En conclusion, une ressemblance remarquable existe entre le système d'hydroxylation d'Udenfriend et le système polyphénoloxydase-acide ascorbique-oxygène. Dans les deux cas des radicaux libres et H_2O_2 sont formés. L'action de la catalase semble indiquer que le premier serait identifiable à la réaction de Fenton, alors que le second pourrait être analogue au système générateur de $HO_2^{\bullet}$ décrit précédemment.

D. - **Conclusion**

Le rappel des principales propriétés de la polyphénoloxydase et des différentes théories proposées pour expliquer son mécanisme d'action établit que, quel que soit le mécanisme intime des réactions conduisant à l'hydroxylation des monohydroxyphénols, l'action essentielle de l'enzyme est de catalyser la transformation du monophénol d'abord en l'orthodiphénol correspondant puis en son orthoquinone, cette dernière évoluant par une suite de réactions complexes vers la formation de pigments et de polymères.

Dans le cas de l'oxydation de la tyrosine, l'enchaînement des réactions qui conduisent finalement à la formation des mélanines comprend la transformation initiale, catalysée par l'enzyme, de tyrosine en DOPA-quinone. Toutefois la présence indiscutable de la DOPA-quinone comme terme intermédiaire unique et obligatoire de l'oxydation de la tyrosine n'a pas encore reçu de démonstration expérimentale certaine.

II. - **OXYDATION DES PROTÉINES PAR LA POLYPHÉNOLOXYDASE**

Connaissant les particularités de l'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase et le fait qu'elle conduise à la formation de pigments insolubles, il pouvait paraître utile de rechercher des renseignements sur le mode d'action de l'enzyme et sur la participation des protéines au processus de la mélanogénèse par l'étude de l'oxydation éventuelle des résidus de tyrosine des peptides et des protéines.

EXPOSE DES TRAVAUX ANTERIEURS

Les premiers travaux sur la question sont dus à Sizer (63, 64-70) qui, grâce à la mesure de la consommation d'oxygène et aux modifications de leur spectre d'absorption en lumière ultraviolette, a constaté l'oxydation de diverses protéines par la polyphénoloxydase de champignon. De plus, certains arguments indiquaient que les restes de tyrosine contenus dans les protéines étaient impliqués dans cette oxydation. Parmi ceux-ci : *a*) la spécificité bien connue de l'enzyme pour les substrats phénoliques ; *b*) la disparition d'une partie de la tyrosine dans les

protéines oxydées, mise en évidence par la réaction de Millon effectuée soit directement sur les protéines oxydées, soit sur des hydrolysats de ces protéines et *c*) l'analogie entre l'évolution des spectres en lumière ultraviolette des protéines étudiées et de divers peptides ou esters de tyrosine (en particulier le N-formyl tyrosine-éthylester) soumis à l'action de la polyphénoloxydase. Les modifications spectrophotométriques, caractérisées par une augmentation globale de l'absorption dans l'ultra-violet et par une diminution de la valeur de la différence entre le maximum et le minimum d'absorption ont été retrouvées pour toutes les protéines oxydées par l'enzyme. Sizer (63) avait conclu de ses recherches : *a*) que certaines protéines, en particulier les enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, chymotrypsine), étaient facilement oxydées par la polyphénoloxydase alors que d'autres (sérumalbumine et gammaglobuline humaines, bétaglobuline bovine, insuline) n'étaient pas oxydables directement mais pouvaient le devenir après traitement préalable par la trypsine ; *b*) que l'activité protéolytique des enzymes ne diminuait pas sensiblement après oxydation d'une partie des restes de tyrosine qu'ils contenaient.

Ces expériences ont toutefois donné lieu à des critiques concernant tant la pureté des substrats utilisés que les conclusions qui en avaient été tirées.

Edman (71) notamment a repris les travaux de Sizer d'une manière plus rigoureuse sur le plan expérimental et a fait remarquer que la majeure partie de l'oxygène consommé pouvait provenir de l'oxydation non des résidus de tyrosine des enzymes protéolytiques utilisés comme substrats, mais de tyrosine libre ou de peptides existant préalablement à l'état d'impuretés ou ayant pris naissance par autolyse partielle de ces protéines au cours de l'incubation. En outre, les activités protéolytiques des enzymes après oxydation avaient été mesurées en prenant comme référence les témoins incubés dans les mêmes conditions, mais en présence de polyphénoloxydase inactivée par la chaleur. Edman a montré que la conservation de l'activité par rapport aux témoins était peu significative car, indépendamment de l'oxydation, les conditions de pH, de température et d'agitation réalisées au cours des incubations avaient pour résultat de faire perdre pratiquement toute activité aux enzymes protéolytiques, par dénaturation.

La réalité de l'oxydation de certaines protéines a cependant été établie par la suite dans de meilleures conditions expérimentales. Les sources d'erreurs, en particulier celles liées au manque d'homogénéité des substrats, ont été éliminées dans un certain nombre de travaux récents, réalisés avec des protéines convenablement purifiées (32, 72-79).

Les études de Yasunobu et coll. (32, 75, 76) notamment ont montré que les peptides de poids moléculaire inférieur à 4.600

étaient généralement oxydés par la polyphénoloxydase (32). Il en était de même pour certaines protéines comme la ribonucléase et l'α-lactalbumine (75), tandis que d'autres, comme la β-lactoglobuline (75), le lysozyme (76) ou l'insuline (32) ne subissaient aucune modification. Dans le cas de la ribonucléase, l'oxydation conduisait à la consommation de 1,1 molécule d'oxygène par molécule de protéine, ce qui aurait été théoriquement suffisant pour transformer un reste de tyrosine (sur les six que contient le molécule) en DOPA-quinone. Pour l'α-lactalbumine (qui contient cinq résidus de tyrosine), l'oxydation s'accompagnait de la consommation de 5 molécules d'oxygène par molécule de protéine et de la disparition de 72 p. cent de la tyrosine.

Par ultracentrifugation et électrophorèse en veine liquide, Yasunobu a montré également qu'aucune protéolyse ne survenait en cours d'incubation et que ni la mobilité électrophorétique en milieu alcalin, ni la constante de sédimentation n'étaient modifiées après oxydation de l'α-lactalbumine par la polyphénoloxydase. En outre, l'étude du spectre d'absorption en lumière ultraviolette de la protéine oxydée lui a permis de confirmer l'augmentation globale de l'absorption et de mettre en évidence l'apparition d'une bande d'absorption dont le maximum se situe à 350 mμ. Cette bande, qui n'apparaît pas au cours de l'oxydation de la tyrosine, de la DOPA ou de peptides de tyrosine dans lesquels cet acide aminé est situé en position N-terminale, est observée toutes les fois que sont oxydés des peptides ou des protéines dans lesquels des restes de tyrosine sont inclus au sein de la chaîne.

Ces expériences, si valables soient-elles, ont cependant été réalisées en utilisant une préparation enzymatique commerciale (Reheis) dont la fabrication est actuellement suspendue et dont le degré de purification n'était pas précisé. Les protéines étudiées ont de plus été soumises, en présence d'enzyme, à des incubations de longue durée (12 à 18 heures) et il n'est pas exclu qu'une dénaturation partielle ait pu survenir au cours de l'agitation du milieu. Enfin, la nature des produits formés à partir des restes de tyrosine oxydés par la polyphénoloxydase n'a pas été étudiée.

De nombreux problèmes concernant l'oxydation des protéines par la polyphénoloxydase restent donc posés. Ils concernent entre autres : 1) l'influence sur des protéines possédant une activité biologique de l'oxydation de un ou plusieurs restes de tyrosine ; 2) la nature des produits formés à la suite de l'oxydation des résidus de tyrosine ; 3) l'évolution chimique ultérieure de ces résidus : 4) les relations existant entre la structure des protéines et le caractère oxydable ou non des restes de tyrosine entrant dans leur constitution.

Ce dernier point appelle quelques développements complémentaires. On sait, en effet, que la structure des protéines conditionne la réactivité chimique des groupements fonctionnels des acides aminés entrant dans leur constitution. Cette réactivité est sous la dépendance de deux facteurs d'ordre général, pouvant agir en « masquant » les groupements à leurs réactifs : ce sont d'une part un facteur stérique, en relation avec la configuration spatiale de la molécule et d'autre part un facteur chimique, résultant de la participation des fonctions portées par les chaînes latérales des acides aminés à des liaisons existant au sein de la molécule.

Il semble donc utile, pour mieux comprendre certains aspects des problèmes se rattachant à l'oxydation des résidus de tyrosine des protéines par la polyphénoloxydase, de rappeler quelques notions concernant la structure des protéines, les liaisons participant à cette structure, leurs méthodes d'étude et enfin, leur influence sur la réactivité des groupements fonctionnels des acides aminés.

APERÇU GENERAL SUR LA STRUCTURE DES PROTEINES

A. - Différents types de liaisons rencontrés dans les protéines

Les liaisons participant à la structure des protéines appartiennent à deux grands groupes : les liaisons de covalence et les liaisons non covalentes.

Les liaisons covalentes, qui sont à la base de la structure des protéines, sont les liaisons peptidiques, unissant les acides aminés pour former les chaînes polypeptidiques. Toutefois, à côté d'elles, on trouve d'autres types de liaisons, intéressant plus particulièrement les chaînes latérales des acides aminés : liaisons disulfure, formées par la condensation oxydative de deux groupements thiols appartenant à des résidus de cystéine et, à un degré moindre, liaisons amide, formées entre un résidu de lysine et un résidu d'acide aspartique ou d'acide glutamique (150), ou liaisons ester, une molécule d'acide phosphorique pouvant former un pont en estérifiant d'un côté un résidu de sérine et de l'autre un résidu de sérine ou de thréonine (151, 152).

Les liaisons non covalentes sont représentées principalement par les liaisons hydrogène, qui jouent un rôle essentiel dans la structure des protéines. Elles ont été mises en évidence initialement par Mirsky et Pauling (153) et l'étude de leur localisation, ainsi que celle de leur influence sur la configuration spatiale et sur la réactivité des protéines a fait depuis l'objet de nombreuses recherches. Leur formation résulte de la tendance qu'ont les atomes d'hydrogène, lorsqu'ils sont unis à un atome électronégatif (O, N ou S) par une liaison covalente polarisée,

de capter partiellement un doublet d'électrons d'un autre atome (O, N ou S) appartenant à un groupement existant dans leur voisinage, selon par exemple :

De nombreuses variétés de liaisons hydrogène peuvent exister, tenant à la nature et au nombre des groupements donneurs et accepteurs de protons (liaisons simples ou doubles, homologues ou hétérologues, faisant intervenir des groupements —OH, =C=O, =NH ou, moins fréquemment, —SH). L'énergie de ces liaisons, considérées individuellement, est relativement faible (de l'ordre de 5 à 6 Kcal. par mole) ce qui explique leur labilité, mais lorsqu'elles existent en grand nombre dans une molécule, elles créent une structure stable par effet additif.

D'autres liaisons non covalentes participent également, mais à un degré moindre, à la structure des protéines. Ce sont d'une part des liaisons salines formées entre fonctions acides et basiques d'amino-acides diaminés et diacides (il s'agit en réalité plutôt d'attractions électrostatiques que de liaisons vraies) et d'autre part des liaisons hydrophobes, pouvant se créer entre les chaînes grasses non polaires de divers acides aminés. Toutefois, si l'existence de ces dernières a été démontrée dans certains polypeptides synthétiques (poly-D-L-alanine) (154), elle ne l'a jamais été de façon certaine dans les protéines naturelles.

Enfin, peuvent également intervenir dans la structure des forces d'attraction électrique résiduelles ou forces de Van der Waals.

B. - **Participation de ces liaisons à la structure des protéines**

Différentes méthodes physiques (mesure de la constante de diffusion, étude de la viscosité, de la biréfringence d'écoulement, des spectres de diffraction des rayons X, de la diffusion de la lumière) appliquées à l'étude des protéines ou de leurs solutions ont permis de déterminer la taille et la forme de diverses molécules protéiques. Certaines d'entre elles (protéines fibrillaires) présentent la forme de rubans, tandis que d'autres (protéines globulaires) affectent celle d'ellipsoïdes plus ou moins allongés. En outre, l'étude de la diffraction des rayons X a montré que les chaînes polypeptidiques des protéines peuvent exister soit sous la forme dite en extension maximum, les angles de valence des atomes de carbone et d'azote imposant cependant une structure plissée, en zig-zag, soit, plus généralement sous forme hélicoïdale (hélice α de Pauling) résultant d'un plus grand degré d'organisation, créé par un plissement de la chaîne. Ce plissement, qui conditionne la configuration en hélice, est

sous la dépendance de liaisons hydrogène formées entre les groupements =CO et =NH des liaisons peptidiques (« épine dorsale » de la chaîne). Dans les protéines globulaires, on pense que la configuration en hélice des chaînes polypeptidiques coexiste, suivant les régions de la molécule, avec des structures moins organisées telles que la configuration en extension maximum ou des structures en hélice, mais orientées de façon moins rigoureuse. En outre, la chaîne peut subir un certain nombre de plicatures supplémentaires conditionnées par l'existence soit de ponts disulfure, soit de liaisons non covalentes existant entre les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés. Il en résulte un ensemble compact, dans lequel les groupes polaires sont en général situés à la surface de la molécule et les groupes non polaires orientés vers l'intérieur.

Ces différentes configurations, et les liaisons dont elles résultent, contribuent à donner à la molécule sa forme dans l'espace et à la stabiliser.

Les protéines naturelles peuvent être constituées d'une seule chaîne présentant tout ou partie des éléments de structure que nous venons d'envisager, ou de plusieurs chaînes identiques ou différentes. Dans ce cas, les chaînes sont unies entre elles par des liaisons soit covalentes (ponts disulfure unissant les chaînes A et B de l'insuline), soit non covalentes (liaisons ioniques et hydrogène : globine de l'hémoglobine).

Plusieurs chaînes protéiques identiques peuvent également être réunies pour former des assemblages moléculaires, la cohésion étant assurée par des liaisons covalentes (ponts disulfure dans la kératine) ou des liaisons hydrogène (fibroïne de la soie).

On subdivise généralement les facteurs intervenant dans la structure interne des protéines en structure primaire, structure secondaire et structure tertiaire. Différentes classifications ont été proposées pour définir ces diverses structures.

Pour Linderström-Lang (155), la structure primaire est représentée par les liaisons peptidiques et la séquence des acides aminés des chaînes polypeptidiques, la structure secondaire concerne la forme de la chaîne polypeptidique (liaisons hydrogène de l'épine dorsale de la chaîne, responsables de la configuration en hélice) et la structure tertiaire comprend les interactions entre les groupements portés par les chaînes latérales des acides aminés (essentiellement ponts disulfure et liaisons hydrogène). Un autre type de classification, qui sera adopté au cours de ce travail, consiste à conserver la même définition pour la structure primaire, mais à considérer comme structure secondaire toutes les liaisons covalentes (principalement les

ponts disulfure) et comme structure tertiaire toutes les liaisons non covalentes (essentiellement les liaisons hydrogène) déterminant la configuration spatiale de la molécule.

C. - Influence de la structure tertiaire sur la réactivité des protéines

La structure tertiaire, représentée essentiellement par les liaisons hydrogène, conditionne en partie la configuration spatiale des molécules protéiques. Son intégrité est nécessaire dans la majorité des cas pour que les protéines actives manifestent avec le degré maximum leur activité enzymatique. Inversement, des modifications de la structure peuvent, dans certains cas, contribuer à l'activation d'un enzyme à partir d'un précurseur inactif. Divers exemples sont connus, parmi lesquels le plus étudié concerne l'activation du trypsinogène par la trypsine (rapporté dans 156). Au cours de ce processus, la rupture sélective d'une liaison peptidique amène la libération de l'hexapeptide N-terminal et, de ce fait, un remaniement de la structure tertiaire de la nouvelle extrémité N-terminale qui, d'un état étiré, passe à une configuration en hélice. Ce plissement permettrait la création du centre catalytique, conditionné par le rapprochement d'un résidu de sérine et d'un résidu d'histidine qui se trouvaient éloignés l'un de l'autre dans le précurseur inactif.

La présence des liaisons hydrogène est également responsable de diverses modifications de la réactivité, tant de la réactivité générale de la protéine que de celle des groupements fonctionnels des acides aminés qu'elle contient. Ces liaisons influent notamment sur les phénomènes suivants (157) : 1) réactivité chimique et ionisation des groupements participant à la liaison hydrogène, 2) liaison avec les petites molécules ou avec les ions, 3) stabilisation des liaisons covalentes, 4) agrégation et 5) dénaturation des protéines.

1) Réactivité des groupements fonctionnels des acides aminés. — Ionisation.

Les propriétés chimiques ou physico-chimiques des groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés entrant dans la constitution des protéines sont très souvent différentes de celles observées dans le cas des acides aminés libres. La plupart des différences observées peuvent être attribuées à la participation de ces groupements à des liaisons intervenant dans la structure des protéines (liaisons hydrogène principalement). Quelquefois également, la configuration spatiale de la molécule résultant de l'existence de ces liaisons a pour effet soit de « masquer » un certain nombre de groupements polaires à l'intérieur de l'édifice moléculaire et de les

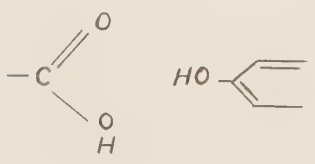
soustraire à l'action de leurs réactifs spécifiques, soit au contraire d'augmenter leur réactivité.

De nombreux exemples de diminution de la réactivité des groupements par participation à des liaisons hydrogène sont connus. Ils peuvent intéresser : les groupements hydroxyles aliphatiques de la sérine ou de la théonine, les groupements guanidiques de l'arginine, les groupements ε-aminés de la lysine, les groupements imidazoles de l'histidine, les groupements thiols de la cystéine, la fonction phénol de la tyrosine. Dans presque tous les cas, la destruction de la structure tertiaire a pour conséquence de faire retrouver à ces groupements leur réactivité normale.

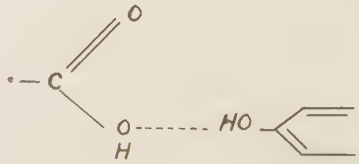
Quelquefois par contre, la configuration de la molécule liée à ses structures secondaire et tertiaire semble accroître ou orienter la réactivité de certains groupements. C'est ainsi que la sensibilité à l'alkylation par l'acide monoiodacétique d'un résidu d'histidine contenu dans le centre actif de la ribonucléase (158) semble gouvernée par la configuration de la molécule autour de ce résidu. Le traitement de la ribonucléase par des agents susceptibles de rompre les liaisons hydrogène (urée 8 M), ou le clivage des ponts disulfure (par oxydation ou par réduction) aboutissent en effet à une perte de la réactivité de ce résidu d'histidine, vraisemblablement par suite de modifications dans la structure de la protéine.

Une autre propriété dont le caractère peut également être modifié concerne l'ionisation des groupements fonctionnels des chaînes latérales d'acides aminés faisant partie de la liaison hydrogène.

Le raisonnement sur un cas concret permettra de mieux comprendre cette influence. Considérons par exemple un groupement carboxylique (acide aspartique ou acide glutamique) et un groupement phénolique (tyrosine) contenus dans une protéine et situés, du fait de la configuration de la molécule, au voisinage l'un de l'autre.



(I)



(II)

Ces deux groupements peuvent être libres (I), ne pas être unis par une liaison hydrogène ; leurs pK seront alors identiques à ceux qui sont observés, dans un solvant donné, pour des solutions d'acides aminés libres ou de peptides de faible poids

moléculaire. Ils peuvent également être unis par une liaison hydrogène (II), le groupement phénolique de la tyrosine jouant alors le rôle de donneur de proton. Dans ces conditions, l'ionisation du groupement phénolique, c'est-à-dire la dissociation d'un proton de ce groupement, doit être plus difficile que dans le cas d'une fonction phénol libre puisque cette réaction doit s'accompagner en même temps de la rupture de la liaison hydrogène. Il en résulte que le groupement phénolique devrait se comporter comme un acide plus faible, ayant un pK plus élevé.

Inversement, si l'on considère le groupement carboxylique, la dissociation d'un proton doit être plus facile puisque la base conjuguée, c'est-à-dire l'anion carboxylate, a déjà accepté partiellement un proton. Le groupement acide carboxylique devrait donc se comporter comme un acide plus fort, ayant un pK plus bas.

Dans les deux cas, les constatations expérimentales apportent la confirmation de cette hypothèse : pour certaines protéines, on trouve que les valeurs du pH d'ionisation des groupements phénoliques et carboxyliques correspondent à celles observées dans le cas des acides aminés libres ou de petits peptides (« pH d'ionisation normal ») ; pour d'autres, au contraire, tout ou partie de ces groupements présentent des valeurs du pH d'ionisation trop élevées pour les groupements phénoliques et trop basses pour les groupements acides carboxyliques (pH d'ionisation « anormalement élevé » ou « anormalement bas »). Dans ce dernier cas, ces observations constituent un argument en faveur de l'existence de liaisons hydrogène entre les groupements étudiés.

2) Liaison de petites molécules ou d'ions aux protéines.

Outre leur caractère d'accepteurs ou de donneurs de protons, certains groupements ionisables portés par les chaînes latérales d'acides aminés sont susceptibles de se lier à divers autres éléments tels que des anions (Cl^- par exemple), des cations (métaux...), des colorants organiques, etc. Si les groupements intéressés participent à l'intérieur de la molécule à des liaisons hydrogène, les propriétés d'union avec d'autres éléments en seront affectées.

Inversement, si les groupements donneurs ou accepteurs de protons participant à des liaisons hydrogène peuvent s'unir à de petits ions (ou à des molécules) autres que les protons, les liaisons hydrogène seront rompues. C'est par ce mécanisme que s'expliquent les propriétés dénaturantes d'agents tels que l'urée, les thiocyanates, les ions guanidinium ou l'ATP, qui sont des réactifs utilisés couramment pour rompre les liaisons hydrogène.

3) Stabilisation des liaisons covalentes des protéines.

Si l'on envisage l'hydrolyse d'une liaison peptidique au sein d'une protéine par un agent spécifique et non dénaturant, on est amené à penser que cette réaction sera affectée par la présence de liaisons hydrogène. L'agent d'hydrolyse devra en effet non seulement hydrolyser la liaison peptidique, mais il devra en outre fournir un apport d'énergie supplémentaire pour rompre les liaisons hydrogène existant parallèlement à la liaison peptidique et la rendant plus stable (en particulier les liaisons hydrogène de l'épine dorsale de la chaîne polypeptidique). Pour des liaisons entre mêmes acides aminés, donc identiques sur le plan thermodynamique, l'hydrolyse sera donc plus difficile dans le cas d'une protéine que dans celui d'un peptide simple, et elle sera en général incomplète. Sur le plan pratique, cette influence des liaisons hydrogène se manifeste notamment dans l'hydrolyse des protéines par les enzymes protéolytiques : l'hydrolyse est beaucoup plus rapide et complète dans le cas des protéines dénaturées (rupture des liaisons hydrogène) que dans celui des protéines natives. Pour ces dernières, la structure covalente est stabilisée par les liaisons hydrogène. De plus, certaines liaisons peptidiques peuvent être masquées à l'intérieur de la molécule du fait de la configuration spatiale (facteur stérique).

On peut concevoir que l'étude de la vitesse d'hydrolyse, par des enzymes protéolytiques, des liaisons peptidiques d'une protéine dont la séquence d'acides aminés est connue serait susceptible de fournir des renseignements sur les parties de la molécule où existent des liaisons hydrogène (159).

4) Agrégation des molécules protéiques.

Il a déjà été signalé que des liaisons non covalentes peuvent être responsables de l'union de plusieurs chaînes polypeptidiques au sein de la même molécule (globine de l'hémoglobine) ou au contraire de l'agrégation de plusieurs molécules, en général de protéines fibreuses, pour former des assemblages moléculaires (fibroïne de la soie).

Un autre exemple d'agrégation de molécules protéiques prenant naissance de façon dynamique au cours de phénomènes physiologiques est représenté par la conversion du fibrinogène en fibrine, survenant au cours de la coagulation sanguine (160) : la thrombine réalise une protéolyse limitée du fibrinogène se traduisant par la libération de peptides (fibrinopeptides A et B représentant environ 3 p. cent du poids moléculaire du fibrinogène), détachés des extrémités N-terminales de la molécule. Le fibrinogène, amputé de ces peptides, est transformé en « monomère de fibrine ». Les monomères de fibrine subissent alors une

polymérisation due à la formation intermoléculaire de liaisons hydrogène (vraisemblablement 19) mettant en jeu des résidus de tyrosine (donneurs de protons) et des résidus d'histidine (accepteurs). Les polymères ainsi formés sont à nouveau soumis à une agrégation (liaisons hydrogène et, en présence d'ions calcium et d'un facteur plasmatique [facteur LL] : liaisons covalentes). De cette dernière agrégation résulte la formation du réticulum de fibrine du caillot.

5) Dénaturation des protéines.

La dénaturation des protéines, qui peut être provoquée par de multiples agents (physiques : chaleur, radiations ultraviolettes, ultrasons, hautes pressions, adsorption, agitation mécanique ; ou chimiques : acides, alcalis, sels de métaux lourds, solutions concentrées d'urée ou de chlorhydrate de guanidine, salicylates, détergents anioniques et cationiques) fait intervenir des changements intramoléculaires dans la configuration de la protéine, dus essentiellement à la rupture des liaisons hydrogène, sans modification de la structure primaire.

La rupture totale ou partielle des liaisons hydrogène existant tant dans l'épine dorsale des chaînes polypeptidiques qu'entre les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés a pour conséquence, selon le pourcentage de liaisons détruites, une désorganisation partielle ou totale de la structure de la molécule. Celle-ci passe d'un état organisé, pseudo-cristallin (hélice α, chaînes orientées parallèlement ou régulièrement) à un état amorphe (absence de spectre de diffraction des rayons X) dans lequel les chaînes sont éventuellement maintenues repliées par les ponts disulfure, mais n'ont plus de configuration spatiale qui leur soit propre. La désorganisation de l'architecture de la molécule est responsable des modifications des propriétés des protéines qui sont observées — en totalité ou en partie seulement — au cours de la dénaturation : diminution de la solubilité, agrégation ou dissociation des molécules, réapparition de la réactivité normale des groupements fonctionnels masqués dans la protéine native, changements de propriétés optiques (pouvoir rotatoire, spectre d'absorption), perte de la spécificité biologique et sensibilité à l'attaque enzymatique (enzymes protéolytiques).

Suivant les conditions d'action de l'agent dénaturant en intensité et en durée, l'étendue de la destruction de la structure tertiaire peut être plus ou moins grande. Lorsqu'elle est limitée, la protéine peut, après suppression de l'agent dénaturant, retrouver la totalité des propriétés liées à son état natif. Il s'agit alors d'une dénaturation réversible, dont on connaît de nombreux exemples (ribonucléase dans l'urée 8 M à pH voisin de 7,0 ; trypsine dans HCl 0,01 N à 50° C, etc.).

Cependant, le retour intégral des protéines dénaturées à leur état initial, leur reconversion, n'est pas la règle et très fréquemment les dénaturations sont irréversibles, totalement ou de façon partielle. Dans ce dernier cas, la reconversion peut porter par exemple sur les propriétés spectrales mais non sur la solubilité, ou sur la solubilité mais non sur l'activité biologique. Ces phénomènes de reconversion partielle mettent l'accent sur la différence des propriétés des liaisons hydrogène contenues dans les protéines : réversibilité de la rupture de certains groupes de liaisons conditionnant des propriétés données d'une molécule, mais rupture irréversible de certains autres groupes gouvernant d'autres propriétés.

D. - **Méthodes d'étude de la structure tertiaire des protéines**

Les méthodes physiques d'étude mentionnées précédemment peuvent, dans la mesure où elles permettent de connaître la forme générale des molécules, donner des renseignements globaux sur les structures secondaire et tertiaire puisque ces structures conditionnent en partie la configuration spatiale.

Il existe cependant de nombreuses autres méthodes d'étude permettant d'obtenir des indications plus précises sur la nature et la répartition des liaisons qui participent à la structure tertiaire des protéines. Ces méthodes sont basées, pour la plupart, sur l'étude des phénomènes que nous venons d'envisager, à savoir l'influence des liaisons hydrogène sur la réactivité des protéines. Ce sont principalement : 1) l'étude de la réactivité chimique des groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés, 2) l'étude de l'ionisation de certains de ces groupements, 3) l'étude du pouvoir rotatoire des solutions de protéines, 4) l'étude de l'échange deutérium-hydrogène, 5) la spectrographie infrarouge et 6) la spectrophotométrie et la spectrophotométrie différentielle en lumière ultraviolette.

1) Nous avons déjà vu que la *réactivité chimique* des groupements portés par les chaînes latérales des acides aminés vis-à-vis de certains de leurs réactifs spécifiques habituels peut être totalement ou partiellement supprimée lorsque ces groupements participent à des liaisons hydrogène. L'étude des modifications éventuelles de cette réactivité peut donc fournir des indications sur la participation des groupements étudiés à des liaisons non covalentes à l'intérieur de la protéine, ou sur leur liberté lorsqu'aucune modification n'est observée par rapport aux réactions obtenues avec les acides aminés libres.

2) Il en est de même en ce qui concerne l'étude de l'*ionisation* de certains groupements ionisables des protéines. Nous avons envisagé précédemment, du point de vue théorique, l'influence que peut avoir sur le pK des groupements ionisables

leur participation à des liaisons hydrogène. Les premiers travaux expérimentaux dans ce domaine sont dus à Crammer et Neuberger (161). Ces auteurs, étudiant, par les modifications du spectre d'absorption dans l'ultraviolet qu'elle provoque, l'ionisation des groupements phénoliques des résidus de tyrosine de l'ovalbumine ont vu que certains d'entre eux s'ionisent à un pH « anormalement élevé » ; ils en avaient conclu que ces fonctions phénoliques devraient participer à des liaisons hydrogène.

Depuis ces travaux, l'étude, par titrimétrie ou spectrophotométrie, de l'ionisation de diverses fonctions contenues dans les protéines, en particulier des groupements phénoliques et des groupements carboxyliques, a été largement utilisée et a donné des résultats fructueux.

3) La *mesure du pouvoir rotatoire* des solutions de protéines est susceptible elle aussi de fournir des indications sur la structure interne des molécules. Cette propriété est en effet très sensible aux changements de configuration, notamment à ceux résultant du passage de la forme hélice α à la chaîne non orientée. Les conclusions tirées des observations effectuées jusqu'ici sont encore limitées car on ne connaît pas de façon précise les relations existant entre le pouvoir rotatoire et la structure de la molécule ; toutefois la comparaison avec des modèles synthétiques présentant ou non une structure organisée (polypeptides ou polymères) a permis, pour certaines protéines, de déterminer les proportions relatives dans la molécule de la forme hélice et de la forme en extension.

En outre, du point de vue cinétique, les variations brusques du pouvoir rotatoire observées au cours de la dénaturation des protéines traduisent le passage d'une structure organisée à une structure lâche et sans organisation : Harrington et Schellman (117) ont noté que le pouvoir rotatoire de solutions de ribonucléase ($[\alpha]_D = -74°$) prend brutalement une valeur plus négative ($[\alpha]_D = -85°$) lorsque la protéine est chauffée au-dessus de 60° C à pH = 6,5 et ont vu que le phénomène est entièrement réversible par refroidissement de la solution. Ils ont attribué ces variations à un passage réversible de la forme hélice α à la forme désorganisée (rupture réversible des liaisons hydrogène, en particulier de celles de l'épine dorsale de la chaîne).

4) L'étude de l'*échange deutérium-hydrogène* peut également donner des renseignements sur le nombre et éventuellement la nature des groupements participant à des liaisons hydrogène dans une molécule protéique. La méthode, développée initialement par Linderström-Lang (162, 163), consiste à mesurer la vitesse de l'échange de certains atomes d'hydrogène

avec le deutérium, après mise en solution de la protéine dans l'eau lourde (*).

On admet que les atomes d'hydrogène qui s'échangent très rapidement (en moins de 30 secondes, en solution aqueuse et au voisinage de 0° C) sont des hydrogènes libres alors que ceux qui, dans les mêmes conditions, s'échangent plus lentement ou ne s'échangent pas du tout, participent à des liaisons hydrogène. La cinétique de l'échange est suivie par la mesure de la densité (dans une colonne à gradient de densité) de divers échantillons de la protéine, obtenus à partir de prélèvements effectués à des temps déterminés au cours de l'expérience.

Pour une protéine donnée, le nombre d'atomes d'hydrogène échangés par rapport au nombre d'atomes d'hydrogène théoriquement échangeables (calculés en fonction de la composition en acides aminés de la molécule et du pH auquel est effectuée l'expérience) permet d'avoir une indication sur le nombre de liaisons hydrogène existant dans la molécule.

5) La *spectrographie infrarouge* est également utilisée (bien que de façon partiellement empirique, étant donné la complexité des spectres obtenus avec les molécules protéiques) comme moyen d'étude de la structure tertiaire des protéines. La mesure de l'absorption du rayonnement infrarouge permet la mise en évidence de bandes d'absorption dont les fréquences sont caractéristiques des liaisons entre certains atomes. L'étude des spectres d'absorption de groupements amides, contenus dans des molécules simples utilisées comme modèles, dans différents solvants et à différentes concentrations, a permis de déterminer les fréquences caractéristiques des groupements =C=O et =N—H libres ou participant à des liaisons hydrogène. On a pu constater que, dans ces deux cas, les fréquences sont différentes (164).

L'application de ces résultats à l'étude de polypeptides synthétiques (poly-γ-benzyl-L-glutamate) a montré que la plupart des groupes =CO et =NH de ces composés participent à des liaisons hydrogène, alors que ceux de peptides de poids moléculaire trop faible pour présenter une structure hélicoïdale présentent des fréquences de vibration identiques à celles des groupements =CO et =NH libres.

L'étude des spectres de protéines, d'interprétation plus délicate, a cependant confirmé dans l'ensemble les résultats obtenus avec les polypeptides, notamment en ce qui concerne la richesse en liaisons hydrogène au niveau de l'épine dorsale de la chaîne.

(*) En général, la méthode consiste plutôt à mesurer la vitesse de la réaction inverse, c'est-à-dire l'échange du deuterium avec l'hydrogène, dans une molécule protéique préalablement deutériée.

6) Le *spectre d'absorption* des protéines en lumière ultraviolette, dans la région comprise entre 250 et 310 mμ, est attribué essentiellement à la présence dans ces molécules de résidus de phénylalanine, de tyrosine et de tryptophane.

Des changements de la configuration des molécules au niveau de ces chromophores ou dans leur environnement peuvent conduire à des modifications du spectre d'absorption. C'est ainsi que la participation du groupement phénolique d'un reste de tyrosine à une liaison hydrogène a pour résultat un déplacement du maximum d'absorption de cet acide aminé vers les grandes longueurs d'onde (par exemple : λ max. tyrosine = 274,5 mμ ; λ max. ribonucléase = 277,5 mμ). Inversement, la rupture des liaisons hydrogène conduit à un déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde. De même, l'ionisation des groupements phénoliques conduit à une augmentation de la valeur de l'absorption et à un déplacement du maximum vers les grandes longueurs d'onde. Les différentes modifications du spectre d'absorption des protéines (déplacements du maximum d'absorption vers les plus grandes ou vers les courtes longueurs d'onde, variations quantitatives de la valeur de l'absorption) qui se manifestent sous l'influence de divers facteurs : variations de pH, de température ou addition au milieu d'agents dénaturants résultent soit de l'ionisation des groupements phénoliques, soit de modifications au voisinage des groupements chromophores, soit enfin du déplissement de la molécule qui peut amener au contact du solvant des groupements jusque là masqués à l'intérieur d'une région hydrophobe (165).

Les différences spectrales observées étant cependant assez faibles en général, on obtient une sensibilité et une précision plus grandes des mesures en utilisant la méthode de spectrophotométrie différentielle (voir réf. 160, p. 217).

La méthode consiste non plus à mesurer la valeur de l'absorption d'un composé ou d'une protéine aux différentes longueurs d'onde (en utilisant comme référence le solvant dans lequel sont dissous ces corps) mais à étudier, en fonction de la longueur d'onde, la différence de la valeur d'absorption (positive ou négative) des solutions du composé ou de la protéine dans leur état initial d'une part et après avoir été soumis à l'action de certains réactifs d'autre part (modification de pH par exemple).

Dans le cas d'une protéine, une modification de la structure se traduisant par une faible différence de la longueur d'onde d'absorption maximum, qui peut passer inaperçue en utilisant la méthode spectrophotométrique normale, se manifeste par un accident nettement visible et mesurable en spectrophotométrie différentielle.

E. - Application de ces méthodes à l'étude de la structure de la ribonucléase

De nombreuses études concernant la structure tertiaire des protéines ont été réalisées sur la ribonucléase. En effet, la connaissance de la structure covalente de la molécule permet d'interpréter plus facilement les résultats expérimentaux. De plus, la localisation des ponts disulfure autorise au départ à imaginer un modèle à trois dimensions, et à raisonner sur lui, en restreignant dans une certaine mesure les risques d'erreurs. Enfin, la ribonucléase est un enzyme et l'étude des variations de son activité en fonction de modifications apportées à sa structure peut fournir d'utiles renseignements.

Un grand nombre de données expérimentales ont conduit à penser que la molécule native est repliée, sous forme compacte (30 × 30 × 38 angströms) (166), cette configuration étant maintenue non seulement par des liaisons covalentes (ponts disulfure) mais également par des liaisons hydrogène. Les agents dénaturants, rompant spécifiquement ces dernières, conduisent en effet à une désorganisation complète de la structure.

De même, l'oxydation des ponts disulfure (85) transforme la molécule en une chaîne présentant une configuration hélicoïdale lâche et non organisée (117) dans laquelle tous les atomes d'hydrogène s'échangent très rapidement avec le deutérium (167). L'étude de l'ionisation des groupements phénoliques des résidus de tyrosine de la ribonucléase (114, 115, 117-119) réalisée soit par titrimétrie, soit par spectrophotométrie (ou spectrophotométrie différentielle) dans l'ultraviolet a montré que trois des six restes de tyrosine contenus dans la molécule s'ionisent de façon réversible et présentent un pK analogue à celui du groupement phénolique de la tyrosine libre (pH d'ionisation compris entre 7,0 et 11,4) alors que les trois autres s'ionisent de façon irréversible et présentent un pK plus élevé (pH d'ionisation compris entre 11,4 et 13,5).

Parallèlement, un certain nombre de groupements carboxyliques ont un pK « anormalement bas ». De ces observations, on a conclu que trois des six résidus de tyrosine de la ribonucléase participent à des liaisons hydrogène dans lesquelles sont impliqués également des groupements carboxyliques ou des ions carboxylates. Lorsque la protéine est mise en solution dans un solvant dénaturant qui rompt les liaisons hydrogène (urée 8 M ou chlorhydrate de guanidine 5 M - urée 1,2 M), les six groupements phénoliques et la totalité des groupements carboxyliques s'ionisent dans des zones de pH analogues à celles observées dans le cas des acides aminés libres (119, 168, 169). Ceci confirme l'existence de liaisons hydrogène entre des grou-

pements phénoliques et des groupements carboxyliques de la protéine.

Les essais d'iodation de la tyrosine contenue dans la molécule de ribonucléase (170) ont montré que sur les six résidus, trois sont rapidement transformés en diiodotyrosine : ce sont ceux qui présentent une « ionisation normale » ; un quatrième s'iode beaucoup plus lentement et les deux derniers ne subissent aucune iodation. Dans le cas du lysozyme, aucun des résidus de tyrosine de la protéine n'est transformé en iodotyrosine (171).

Il a en outre déjà été signalé (p. 32) que la structure tertiaire de la ribonucléase est responsable de la réactivité particulière d'un résidu d'histidine, contenu dans le centre actif, vis-à-vis de l'acide monoiodacétique (158).

L'importance du rôle joué par les liaisons hydrogène dans la structure de la ribonucléase a également été mise en évidence par les études de Richards (172, 173) ayant trait à l'action de la subtilisine sur cette protéine. Cette action se traduit par la rupture d'une seule liaison peptidique, située entre le 20e et le 21e résidu d'acide aminé à partir de l'extrémité N-terminale. Le peptide, ainsi détaché de la chaîne primaire, ne se sépare pas cependant du reste de la molécule auquel il continue à être uni par des liaisons hydrogène, l'activité enzymatique de la ribonucléase étant intégralement conservée. Par contre, la mise en solution dans l'urée 8 M de la protéine ainsi traitée provoque la séparation du peptide et la perte totale de l'activité enzymatique.

L'étude cinétique de l'échange deutérium-hydrogène dans la molécule de ribonucléase (174) a montré que sur 245 atomes d'hydrogène théoriquement échangeables à pH = 4,8, 175 s'échangent rapidement à 0° C, alors que 70 s'échangent plus lentement ou pas du tout. Ceci a permis de conclure qu'il existe dans la molécule environ 70 liaisons hydrogène et qu'approximativement 60 p. cent de la chaîne polypeptidique présente une configuration en hélice α. Enfin, les données apportées par la spectrophotométrie différentielle dans l'ultraviolet (modifications du spectre en fonction du pH, de la température, des solvants) ont conduit à émettre diverses hypothèses sur la position de certains groupements les uns par rapport aux autres dans la protéine native. L'ensemble des données apportées par les différents moyens d'étude de la structure tertiaire des protéines a permis à Sheraga (159, p. 283, 175) de construire un modèle dans l'espace de la molécule de ribonucléase. Ce modèle est constitué de six fractions de molécule présentant une configuration en hélice α et de six autres ayant une configuration non hélicoïdale. Les différentes parties sont orientées les unes par rapport aux autres de façon telle que des groupements

réactifs donnés soient amenés au voisinage les uns des autres pour rendre compte des données expérimentales (par exemple : position des ponts disulfure, voisinage des groupements phénoliques et des groupements carboxyliques, nombre total de liaisons hydrogène, etc.). Les dimensions de la molécule-modèle ainsi constituée semblent en accord avec celles déterminées par les méthodes physiques.

Il ne s'agit là toutefois que d'une hypothèse de structure, rendant compte de certaines des propriétés observées, mais son but est avant tout de fournir une base pour les recherches ultérieures.

OBJET ET INTÉRÊT DU TRAVAIL

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposé :

I. — D'étudier certains aspects du mécanisme d'action de la polyphénoloxydase et en particulier :

a) de montrer la formation possible dans le milieu d'incubation des premières molécules de DOPA à partir de la tyrosine, par un mécanisme non enzymatique. Un tel processus est nécessaire à l' « initiation » de la réaction enzymatique, si l'on admet la théorie de l'orthoquinone, dont le mécanisme a été évoqué précédemment ;

b) de démontrer que la DOPA-quinone est un intermédiaire obligatoire et unique dans l'oxydation de la tyrosine en mélanines par la polyphénoloxydase, en utilisant pour cela la propriété que possède l'acide ascorbique, lorsqu'il est en excès dans le milieu, de bloquer la mélanogénèse par réduction continuelle en DOPA de la DOPA-quinone formée au cours de la réaction.

II. — D'apporter des preuves chimiques directes en faveur de l'oxydation des restes de tyrosine de certaines protéines natives ou dont la structure a été préalablement modifiée et d'analyser le mécanisme de cette oxydation.

On peut espérer tirer d'une telle étude un certain nombre de conclusions intéressantes à divers points de vue :

— Le premier d'ordre biologique, concernant la mélanogénèse *in vivo*. On sait que, dans les cellules, les mélanines existent sous forme de grains dans lesquels le pigment est presque toujours associé à des protéines. Le problème se pose donc de savoir si les mélanines sont formées à partir de la tyrosine ou de la DOPA libres existant dans les tissus et sont ensuite conjuguées avec la protéine, ou bien si ce sont les restes de tyrosine des chaînes polypeptidiques qui sont oxydés pour donner lieu à la formation des grains de mélanine. Il est cependant permis de penser que, dans ce dernier cas, le blocage du groupement aminé de la tyrosine par une liaison peptidique doit interdire, soit pour des raisons chimiques, soit par encombrement stérique, toute cyclisation de la chaîne latérale et par là, ne pas permettre aux restes de DOPA-quinone formés d'évoluer vers la formation de pigments, comme le font les molécules de DOPA-quinone dans le cas de l'oxydation de la tyrosine libre par la polyphénoloxydase.

— Le second d'ordre enzymatique : en effet, si divers réactifs chimiques sont capables de modifier certaines fonctions portées par les chaînes latérales d'acides aminés libres ou inclus dans des chaînes protéiques, on connaît très peu d'enzymes susceptibles d'avoir une action comparable. Si l'on excepte la polyphénoloxydase, seules les peroxydases ont fait jusqu'ici l'objet de quelques recherches (70, 80).

— Le dernier enfin concernant la structure et l'activité des protéines : l'oxydation par un agent spécifique et non dénaturant d'un ou de plusieurs résidus de tyrosine au sein d'une protéine possédant une activité biologique, permet de savoir si l'intégrité de ces restes de tyrosine est indispensable à la conservation de l'activité de la molécule. En outre, le caractère oxydable ou non des résidus de tyrosine d'une protéine peut donner des indications sur la liberté de leurs groupements phénoliques et sur la possibilité qu'a l'enzyme de parvenir à leur contact. On peut penser, en effet, que le caractère non oxydable d'un reste de tyrosine d'une protéine est gouverné soit par la configuration stéréochimique de la molécule, ce résidu se trouvant masqué à l'intérieur de la molécule, soit à une perte partielle de sa réactivité vis-à-vis des agents extérieurs du fait de sa participation à une liaison hydrogène, soit enfin à ces deux facteurs réunis.

III. — Dans un dernier chapitre, enfin, d'étudier certaines propriétés chimiques et physico-chimiques de protéines oxydées et de protéines dans lesquelles tout ou partie des restes de tyrosine ont été remplacés par des restes de DOPA, après action de la polyphénoloxydase en présence d'un excès d'acide ascorbique.

Chacun de ces trois chapitres, bien que faisant partie d'un même travail d'ensemble, appelle cependant des considérations et des conclusions qui lui sont propres. Il a donc semblé préférable de réunir dans chacun d'eux la partie consacrée aux résultats expérimentaux et la discussion qui s'y rapporte.

RECHERCHES PERSONNELLES

MATERIEL ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Les techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail ressortissent, pour la plupart, aux méthodes biochimiques habituelles. Elles mettent en œuvre principalement la chromatographie, l'électrophorèse, la manométrie par la méthode de Warburg et l'ultracentrifugation. Les méthodes classiques utilisées seront simplement signalées dans ce chapitre ; seules seront développées de façon plus détaillée les modifications apportées à ces méthodes, les techniques originales, diverses conclusions ou considérations établies à l'occasion de leur utilisation et enfin les propriétés particulières de certains substrats.

En outre, diverses techniques utilisées dans des cas déterminés, ou certains détails expérimentaux, seront exposés au cours des chapitres ultérieurs soit dans le texte, soit dans la légende des figures illustrant les résultats qu'ils ont permis d'obtenir.

I. - MATÉRIEL ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS

A. - Enzymes

La polyphénoloxydase de champignon nous a été fournie par le Professeur D. Kertesz et R. Zito (PPO-KZ). Elle a été préparée selon la méthode de purification qu'ils ont décrite (9, 20-22). La solution enzymatique utilisée contenait 13 mg de protéine par ml. L'activité enzymatique a été déterminée en utilisant des méthodes décrites dans la littérature, conduisant à une estimation en unités arbitraires, dont le seul but est de permettre la comparaison de l'activité des différents enzymes utilisés au cours de ce travail. La PPO-KZ possédait, par ml, une activité de 57.500 unités Hogeboom-Adams (81), ou de 87.750 unités spectrophotométriques (U.S.) (soit 6.750 U.S. par mg de protéine). L'unité Hogeboom-Adams est définie par la quantité d'enzyme qui catalyse dans des conditions expérimentales déterminées (en 3 ml de tampon phosphate 0,033 M, à pH = 6,8 et à 37° C) la consommation de 1 µl d'oxygène par minute et par mg de DOPA. L'unité spectrophotométrique résulte d'une détermination effectuée selon la méthode proposée par les Laboratoires Worthington (Worthington Enzymes, descriptive manual n° 9, 1957, p. 36) qui donne, pour unité enzymatique (U.S.), la quantité d'enzyme provoquant une augmentation de la densité optique à 280 mµ de 0,001 unité par minute, dans des conditions opératoires définies (pH = 6,5, en

tampon phosphaté 0,16 M, dans un volume final 3 ml et à la température de 20° C) en utilisant la tyrosine (1.10^{-3} M) comme substrat.

La PPO-KZ était homogène à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation.

L'inactivation de l'enzyme a été obtenue, après un délai de quelques secondes, par addition de HCN à la concentration finale 0,01 M (voir référence 82) et, de façon instantanée par acidification du milieu au moyen de HCl à la concentration finale 0,05 N ou, de préférence, d'acide acétique à la concentration finale 0,5 à 1 N. Ce dernier présente l'avantage de ne pas provoquer de perturbations dans la migration de la tyrosine lorsque la composition du milieu est étudiée par chromatographie sur papier, avec développement en n-butanol - acide acétique - eau (voir méthodes).

Des préparations commerciales (lyophilisées) de polyphénoloxydase de champignon ont également été utilisées.

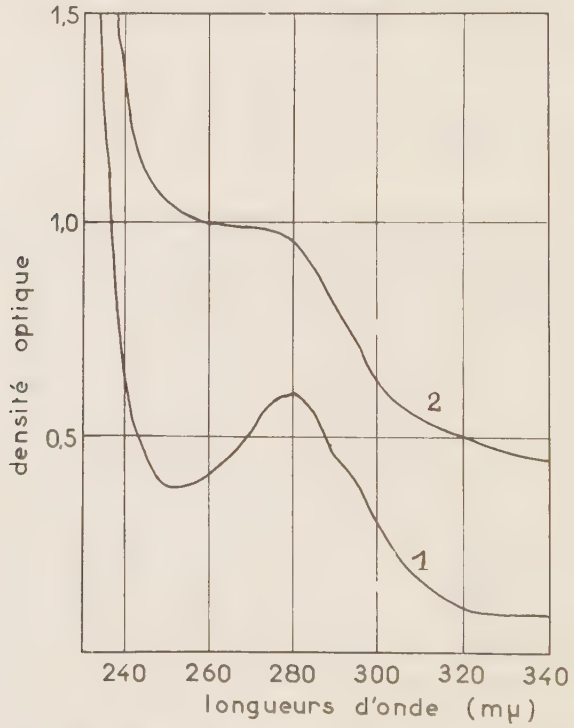


Fig. n° 1. — Enregistrement des spectres d'absorption en lumière ultraviolette de deux préparations de polyphénoloxydase de champignon, en solution dans l'eau (0,25 mg par ml) :

1) PPO-KZ ; 2) PPO-L.

Elles provenaient des laboratoires Light (*) (PPO-L) et Worthington (**) (PPO-W). Leur activité enzymatique était respectivement de 100 et 170 U.S. par mg. Les solutions dans l'eau de ces enzymes étaient très colorées (brunâtres) alors que la préparation de Kertèsz était légèrement ambrée. Les spectres d'absorption dans l'ultraviolet de deux de ces préparations sont indiqués dans la figure 1.

La préparation très purifiée d'enzyme principalement utilisée dans ce travail (PPO-KZ) est plus sensible aux agents physiques dénaturants (84) que les produits commerciaux moins purs. La PPO-KZ est inactivée lorsqu'elle est placée pendant 20 à 30 secondes dans un bain d'eau à 70° C, alors que 3 à 4 minutes à 100° C sont nécessaires pour inactiver les préparations commerciales (PPO-L et PPO-W). Les solutions de ces deux dernières préparations restent en outre limpides malgré un chauffage prolongé, tandis que la PPO-KZ floculе rapidement au-dessus de 70 à 80° C.

L'agitation mécanique d'une solution diluée de PPO-KZ effectuée dans les conditions existant au cours des incubations (voir méthodes : 0,060 ml de solution d'enzyme dans 3 ml de

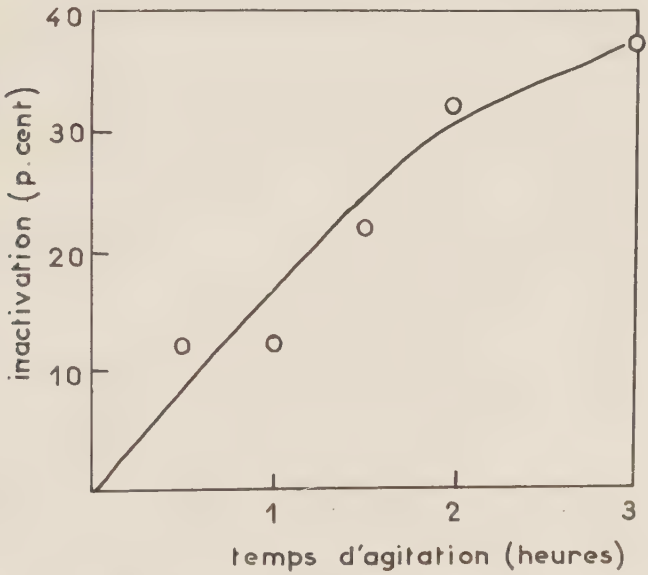


Fig. n° 2. — Inactivation de la PPO-KZ par agitation mécanique. La solution (0.060 ml de PPO-KZ dans 3 ml de tampon phosphate 0,1 M, de pH = 6,8) a été agitée dans l'appareil de Warburg à 100 rotations par minute et à 37° C. Aux temps portés en abscisses, prélèvement de 0,01 ml de la dilution et mesure de l'activité enzymatique par la méthode de Hogeboom et Adams.

(*) Light and Co. Limited, Poyle Colnbrook, Buckinghamshire, Angleterre.
(**) Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N.J., U.S.A.

tampon phosphate 0,1 M, de pH = 6,8 et 100 rotations par minute à 37° C) provoque une diminution de l'activité atteignant 37 p. cent après 3 heures d'agitation (fig. 2).

B. - **Substrats**

La Ribonucléase (pancréas de bœuf, 3 fois recristallisée à partir de l'éthanol) provenait des Laboratoires Worthington. Un certain nombre de lots ont été utilisés au cours du travail : R 16, R 536 B, R 561, R 566, R 568-9, R 570-1, R 574-5, R 578, R 580 et R597.

La protéine ($E_{1\%}^{1\,cm}$ 2.775 angströms = 6,8) était homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse, directement et après 24 heures d'incubation de ses solutions à 37° C, ce qui permettait d'exclure une contamination par des enzymes protéolytiques. Aucune modification de ces propriétés n'a été observée après une dialyse de 16 heures à + 2° C contre de l'eau bidistillée. Les recherches par chromatographie sur papier en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) d'acides aminés libres ou de peptides dans les solutions de ribonucléase fraîchement préparées ou après 24 heures d'incubation à 37° C ont été négatives. Le dosage de l'activité enzymatique, réalisé selon Dickman et Trupin (83) a montré qu'elle ne variait que de ± 10 p. cent pour les différents lots utilisés. Ceux-ci ont été conservés à l'état cristallisé ou en solution (solutions de référence pour le dosage de l'activité enzymatique) au congélateur à — 20° C.

L'agitation mécanique d'une solution de ribonucléase dans les conditions des incubations conduit à une inactivation particlle qui atteint 30 à 40 p. cent après 3 ou 4 heures d'agitation à 37° C. Il a été tenu compte de cette inactivation dans le calcul des activités après oxydation de la protéine.

La ribonucléase oxydée par l'acide performique (« ribonucléase performique ») a été préparée selon la technique décrite par Hirs (85) en oxydant la protéine par l'acide performique à — 10° C. Différents lots de ribonucléase ont été soumis à cette oxydation. L'homogénéité des solutions de ribonucléase performique, ainsi que l'absence dans celles-ci de tyrosine libre ou de peptides de tyrosine ont été vérifiées par ultracentrifugation, électrophorèse et chromatographie sur papier. La molécule de ribonucléase ainsi traitée est transformée en une chaîne polypeptidique de 124 acides aminés, de séquence connue, dans laquelle les 4 restes de cystine sont transformés en 8 restes d'acide cystéique et les 4 restes de méthionine en 4 restes de méthionine sulfone. Ces modifications ont été confirmées par l'étude de la composition en acides aminés d'hydrolysats de ribonucléase performique, après fractionnement sur colonne de

résine échangeuse d'ions (voir méthodes et chap. 3, p. 55). Le dosage de 95 à 100 p. cent de la quantité de tyrosine théorique a, de plus, permis de conclure à l'absence de chlorotyrosine dans la molécule. Enfin, la détermination du poids moléculaire de la ribonucléase performique par la méthode d'équilibre de sédimentation approché (voir p. 70) a montré qu'aucune rupture de la chaîne polypeptidique ne survient au cours de l'oxydation performique : la valeur obtenue (13.000) est en effet très voisine de celle trouvée pour la ribonucléase native (13.700).

D'autres données, qui seront rapportées ultérieurement, ont permis de voir qu'au cours du traitement de la ribonucléase par l'acide performique, les changements intervenus dans la configuration spatiale de la molécule et dans la nature des groupements réactifs de certains acides aminés s'accompagnent de modifications des propriétés physico-chimiques de la protéine : spectre d'absorption en lumière ultraviolette, comportement à l'électrophorèse et à la dialyse. En outre, à l'occasion de mesures de la concentration de certaines solutions protéiques par réfractométrie (voir « techniques expérimentales », p. 70), on a pu constater que les échantillons de ribonucléase native, conservés normalement au congélateur à — 20° C ont une teneur en eau située en moyenne aux environs de 10 p. cent, cette eau pouvant être éliminée à peu près totalement par dessication sous vide en présence de P_2O_5 ; par contre, les préparations de ribonucléase performique, traitées dans les mêmes conditions, conservent une teneur en eau de l'ordre de 12 à 15 p. cent malgré une dessication prolongée. Cette rétention d'eau peut vraisemblablement s'expliquer d'une part, par la libération d'un certain nombre de groupements polaires lors de la rupture des structures secondaire et tertiaire de la molécule, et d'autre part, par l'apparition d'un nombre assez élevé de groupements sulfoniques, de caractère fortement hydrophile, engendrés par l'oxydation performique de la protéine.

La ribonucléase dénaturée par l'urée en milieu alcalin a été obtenue en traitant la ribonucléase native par l'urée 8 M à pH = 10,6 (tampon carbonate-bicarbonate) selon Barnard et Stein (86), pendant 15 heures à 37° C. L'urée a été éliminée par une dialyse prolongée (18 à 72 heures) contre de l'eau bidistillée fréquemment renouvelée. L'absence d'urée en fin de dialyse a été vérifiée par la réaction au para-diméthylaminobenzaldéhyde. La ribonucléase ainsi dénaturée est très peu soluble dans l'eau et un précipité abondant se forme au cours de la dialyse ; sa solubilité est de l'ordre de 0,75 mg par ml. Il est à noter qu'un traitement identique par l'urée 8 M, mais en milieu neutre, ne s'accompagne d'aucune précipitation en cours de dialyse (dénaturation réversible).

L'α-lactalbumine (3 fois recristallisée) nous a été donnée par le Professeur Ottesen (Copenhague). Deux préparations

ont été utilisées : l'une d'elles était soluble dans l'eau pure à une concentration de 2,5 p. cent (lot I) tandis que l'autre (lot II) nécessitait une concentration de 3 p. cent en NaCl pour sa solubilisation à 1 p. cent. Son poids moléculaire était de 16.000 et son coefficient d'absorption dans l'ultraviolet $E_{1\%}^{1\,cm}$ 2.800 angströms = 20,9. Elle était homogène à l'électrophorèse et ses solutions ne contenaient ni tyrosine libre, ni peptides (recherchés par chromatographie sur papier).

Le lysozyme d'œuf de poule (2 fois cristallisé) provenait des Laboratoires Worthington. Les échantillons utilisés ont satisfait aux tests d'homogénéité et d'absence de tyrosine libre et de peptides décrits précédemment.

Le lysozyme dénaturé a été préparé par un traitement du lysozyme natif de 7 heures à 37° C par l'urée 8 M, à pH = 10,6 suivi d'une dialyse de 48 heures contre de l'eau bidistillée. Comme dans le cas de la ribonucléase dénaturée par le même procédé, un précipité abondant s'est formé au cours de la dialyse. Les solutions obtenues après élimination de l'urée et du tampon contenaient par ml environ 0,5 mg de protéine dénaturée.

Le lysozyme réduit par l'acide thioglycolique et traité par l'acide monoiodoacétique (87) nous a été fourni par le Docteur Jollès (Faculté des Sciences, Paris). Ce produit, dans lequel chaque reste de cystine était transformé en 2 restes de S-carboxyméthylcystéine, présentait une très faible solubilité dans l'eau et dans les solutions salines ou tampons au voisinage de la neutralité.

Les échantillons d'*insuline amorphe* provenaient des Laboratoires Lilly (lots W 1282 et W 3255) et ont été mis à notre disposition par le Professeur E. Frieden (Department of Chemistry, Tallahassee, Floride, U.S.A.).

Les acides aminés et dipeptides : L-tyrosine, L-DOPA, D-L-thyronine, glycyl-L-tyrosine et L-Leucyl-L-tyrosine provenaient de Hoffmann-La Roche (Bâle) et étaient chromatographiquement purs.

La glycyl-L-tyrosine-éthylester et la L-leucyl-L-tyrosine-éthylester ont été obtenues selon la méthode classique de Fischer, en faisant barboter HCl gazeux sec dans une solution éthanolique de glycyl-L-tyrosine ou de L-leucyl-L-tyrosine (88).

La tyrosine uniformément marquée par [^{14}C] (9 mc par millimole) provenait de Radiochemical Center, Amersham (Angleterre).

C. - Réactifs

L'acide ascorbique a été fourni par Hoffman-La Roche (Bâle). L'hydroquinone et le pyrogallol étaient des produits purs deux fois recristallisés.

L'acide acétique, l'ammoniaque, la soude, l'urée, le nitrite de sodium, le molybdate de sodium, l'acide citrique, le citrate de sodium, le n-butanol et la pyridine étaient des produits Prolabo-RP ou Merck purissimes, de même que l'acide chlorhydrique, utilisé comme agent d'hydrolyse après une double distillation.

L'α-nitroso-β-naphtol (Prolabo, technique) a été utilisé après recristallisation et le 1:2-dichloroéthane (Prolabo) après redistillation.

La ninhydrine, employée pour le dosage des acides aminés, provenait de Pierce (Pierce Chemical Co, Rockford, Ill., U.S.A.) et le méthylcellosolve (distillé deux fois sur chlorure stanneux) de Prolabo ou des Laboratoires du Bois de Boulogne.

Le pH des tampons a été déterminé avec une précision de ± 0,02 unité (pHmètre Carpéni-Constant).

Toutes les solutions, y compris les tampons, ont été réalisées avec de l'eau désionisée sur résines puis bidistillée dans des appareils entièrement en verre Pyrex ou en quartz.

La verrerie a toujours été lavée avec le mélange sulfochromique ou la potasse alcoolique, selon les cas, et rincée à l'eau ordinaire, puis à l'eau désionisée et enfin à l'eau bidistillée.

II. - TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

A. - Incubations et mesures de la consommation d'oxygène

Elles ont été réalisées dans un appareil de Warburg (Braun, Melsungen, Allemagne) avec une agitation de 100 rotations par minute et à 37° C.

Les conditions d'incubation des substrats simples (tyrosine, DOPA, thyronine, glycyl-tyrosine, leucyl-tyrosine, glycyl-tyrosine-éthylester et leucyl-tyrosine-éthylester) seront exposées en même temps que les expériences auxquelles elles se rapportent.

Dans le cas de l'oxydation des protéines, le milieu contenait en général 6 à 12 mg de protéine dissous dans un tampon phosphate 0,1 M de pH = 6,8 et 0,020 à 0,060 ml de solution d'enzyme pour un volume total de 3 ml. Dans le puits central de la fiole était ajouté 0,1 ml d'une solution KOH à 20 p. cent. Chaque série d'incubations comprenait, outre les essais et le thermo-baromètre, une fiole témoin contenant les mêmes éléments à l'exception de l'enzyme qui était inactivé par la chaleur (30 secondes à 70° C pour l'enzyme de Kertesz et Zito ou 10 minutes à 100° C pour les préparations commerciales).

Les résultats qui seront présentés sont la moyenne des données obtenues, en général, au cours de 3 à 5 séries d'expériences.

B. - **Dialyse**

Après incubation et éventuellement inactivation de l'enzyme par chauffage, les milieux étaient prélevés quantitativement et introduits dans des sacs à dialyse (29/32" Visking Corp.). Ces sacs étaient ensuite fixés sur des tubes de verre et plongés dans un bécher de 3 litres contenant de l'eau bidistillée, à + 2° C, brassée par un agitateur magnétique. Une très légère pression était appliquée à l'extrémité du tube de verre de manière à maintenir le sac gonflé. 12 à 72 heures (en changeant l'eau toutes les 3 ou 4 heures) étaient nécessaires, suivant les cas, pour éliminer complètement les ions du tampon et (ou) l'acide ascorbique.

Des pertes en substrats ont été constatées au cours de la dialyse. L'importance de ces pertes est, pour les sacs utilisés, en relation avec le poids moléculaire et la configuration spatiale (globulaire ou fibrillaire) des molécules protéiques soumises à la dialyse, ainsi qu'en témoignent les résultats exposés dans le tableau I.

TABLEAU I

Pertes en protéines au cours de la dialyse

Les dialyses ont été réalisées selon la technique décrite dans le texte. La détermination de la concentration en protéines des solutions avant et après dialyse a été effectuée par spectrophotométrie (à la longueur d'onde d'absorption maximum de chaque protéine), par réfractométrie et par dosage de la tyrosine après hydrolyse chlorhydrique (en tenant compte de la dilution du milieu en fin de dialyse).

Protéine étudiée	Poids moléculaire	Forme de la molécule	Pertes après 36 h. de dialyse (p. cent)
Ribonucléase native	14.000	globulaire	20 à 25
Lysozyme	15.000	globulaire	10 à 15
α-lactalbumine	16.000	globulaire	0
Ribonucléase performique	14.000	fibrillaire	30 à 35

C. - **Spectophotométrie**

Elle a été réalisée avec les appareils Beckman DU et DK_2 dans des cuves en silice, de longueur optique égale à 1 cm, après inactivation de l'enzyme par la chaleur et éventuellement dialyse. Dans les cas où il a été nécessaire de suivre l'évolution des spectres en cours d'oxydation, à des intervalles de temps rapprochés, l'oxydation a été réalisée directement dans les cuves

de lecture, dans l'eau ou en tampon phosphate dilué, sous un barbotage d'oxygène pur.

D. - **Electrophorèses sur papier**

Elles ont été effectuées selon la méthode horizontale (cuves Label, Rome, Italie) sur papier Whatman n° 1 ou 3 MM, dans les conditions habituelles, ou à contre-courant (reverse-flow) (89). La coloration des protéines a été obtenue par les techniques classiques utilisant le bleu de bromophénol, le noir amide ou la nigrosine.

E. - **Analyse de la composition en acides aminés des protéines**

La composition en acides aminés de certaines des protéines étudiées (ribonucléase native, ribonucléase performique et ribonucléase performique oxydée par la polyphénoloxydase) a été étudiée, après hydrolyse chlorhydrique, au moyen de l'Auto-Analyzer Technicon (Chauncey, N.Y., U.S.A.) en utilisant une technique voisine de celle décrite par Piez et Morris (90). L'analyse chromatographique des hydrolysats a été réalisée sur une seule colonne (133 × 0,9 cm) de résine polystyrène sulfonique (« chromo-beads » Technicon, lot n° 1033, diamètre moyen des particules : 30 microns, remplaçant la résine Dowex 50 X 12 utilisée dans la technique originale) à la température de 60° C. Le gradient de pH et de molarité permettant d'obtenir l'élution convenable des acides aminés a été obtenu grâce à un dispositif commercial (« Varigrad » Technicon) réalisant automatiquement le mélange en quantités convenables d'un tampon acide citrique-citrate trisodique (0,25 M, pH = 2,95) et d'une solution 2,4 N de citrate trisodique. La réaction colorée était effectuée avec un réactif à la ninhydrine, préparé selon les indications du constructeur de l'appareil (ninhydrine : 20 g ; hydrindantine : 1,5 g ; méthylcellosolve : 500 ml ; tampon acétate de sodium-acide acétique 4,0 N, de pH = 5,5 : 500 ml).

Les données quantitatives ont été calculées par intégration de la surface des pics correspondant à chaque acide aminé, selon Moore et Stein (91, 92) et les valeurs reportées sur des courbes d'étalonnage, réalisées avec des quantités connues d'acides aminés.

Les dosages effectués dans ces conditions sur des mélanges témoins d'acides aminés ont montré une bonne reproductibilité des résultats et un rendement de coloration proportionnel aux taux des aminoacides utilisés pour des quantités allant de 0,1 à 2 micromoles. Les variations enregistrées sont de l'ordre de ± 2 à 3 p. cent. De même, des dosages effectués sur des hydrolysats de protéines de composition connue (ribonucléase) ont conduit à l'obtention de valeurs en bon accord avec les valeurs théoriques.

F. - **Séparation et dosage de la tyrosine et de la DOPA dans les hydrolysats de protéines oxydées et dans les milieux d'oxydation de tyrosine**

La DOPA n'étant pas un acide aminé rencontré dans la constitution des chaînes polypeptidiques naturelles, la méthode mentionnée ci-dessus, de même que celles développées antérieurement par Stein et Moore (91 et 92 pour les plus récentes), n'envisagent pas la séparation quantitative de la DOPA en présence de tyrosine et des autres acides aminés contenus dans les protéines. Cette séparation était cependant nécessaire pour doser la DOPA existant tant dans les milieux d'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase que dans certaines protéines soumises à l'action de cet enzyme en présence d'un excès d'acide ascorbique, protéines dans lesquelles tout ou partie des restes de tyrosine ont été transformés en restes de DOPA. Une méthode a donc été mise au point pour réaliser la séparation et le dosage de la tyrosine et de la DOPA dans de telles conditions (93).

— *La séparation de la L-tyrosine et de la L-DOPA* a été réalisée par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions.

La résine (Dowex 50 X 4, 200-400 mesh) provenait de Dow Chemical C° et a été préparée selon Moore et Stein (94). Après un premier traitement par HCl 4N et lavage jusqu'à neutralité du filtrat, on transforme la résine en sel de Na par NaOH 2N. Elle est ensuite remise en suspension dans deux fois son volume de NaOH 2N et placée pendant 30 minutes sous agitation dans un bain-marie à 70-80° C. Après 10 minutes de repos, le surnageant est décanté et l'opération recommencée jusqu'à ce que le surnageant soit limpide et incolore, et la sédimentation homogène. Le sel de sodium de la résine est alors recyclé sous forme H^+ par HCl 4N jusqu'à acidification franche du filtrat, lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralisation et essoré. On transforme enfin la résine en sel d'ammonium par traitement avec NH_4OH 1N jusqu'à alcalinisation franche du filtrat. Après lavage à l'eau distillée, la résine est mise en réserve dans l'eau et conservée à la glacière jusqu'à utilisation.

Les colonnes (0,9 $\times$ 120 cm ou 1,2 $\times$ 120 cm) sont préparées par sédimentations successives de la résine (mise en suspension dans deux ou trois fois son volume d'eau) en segments de 30 à 40 cm. La résine correspondant à un segment est introduite lorsque les 3/4 environ de la résine du segment précédent ont sédimenté, afin d'éviter des variations brusques dans la taille des grains au niveau de la zone de jonction des différents segments. On peut accélérer le chargement en appliquant au sommet de la colonne une pression d'azote de 10 à 15 cm de mercure. Une fois remplie à la hauteur désirée, la colonne est équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 0,2 M de

pH = 5,20 (passage de 300 ml en 12 à 24 heures). Le mélange à chromatographier (volume de 1 à 6 ml) pH compris entre 4,0 et 4,5, est alors déposé sur la surface de la résine et, après absorption, on lave avec 2 ml de tampon acétate d'ammonium 0,2 M, de pH = 4,48.

L'élution est conduite avec un tampon acétate d'ammonium 0,4 M, de pH = 5,64. La vitesse d'élution est réglée par pression hydrostatique (hauteur du récipient contenant le tampon au-dessus de la colonne) de façon telle que des fractions de 2 ml soient collectées toutes les 5 à 8 minutes.

La régénération de la résine après usage doit être réalisée selon la technique de préparation décrite ci-dessus. Après quelques recyclages, le traitement par NaOH 2N peut être pratiqué à la température ordinaire.

500 à 600 g de résine permettent de préparer 4 à 5 colonnes.

La figure 3 illustre la séparation obtenue dans de telles conditions pour un mélange d'acide ascorbique, de tyrosine et de DOPA.

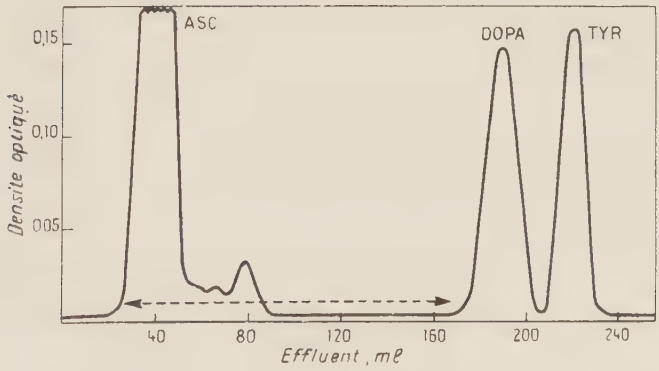


FIG. N° 3. — Séparation de tyrosine, DOPA et acide ascorbique par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions. La colonne de Dowex 50 X 4 (1,2 × 120 cm) était équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 0,2 M de pH = 5,18. Après dépôt à la surface de la résine du mélange contenant : 10 mg d'acide ascorbique, 10 µg de DOPA et 400 µg de tyrosine, élution avec un tampon acétate d'ammonium 0,4 M de pH = 5.64.

Lecture de la densité optique à 279 m_μ pour la DOPA et à 275 m_μ pour la tyrosine.

En pointillé, zone de sortie des acides aminés neutres et acides dans le cas de la chromatographie d'un hydrolysat protéique. La zone qui prolonge le pic de l'acide ascorbique (ASC) correspond à des produits de dégradation de celui-ci.

Dans le cas d'un hydrolysat protéique (ribonucléase) supplémenté avant chromatographie avec 200 µg de DOPA, les résultats obtenus sont identiques. La tyrosine et la DOPA sortent séparément en 10 à 14 fractions de 2 ml pour des quantités de 100 à 200 µg de chacun de ces acides aminés. L'acide ascorbique et ses produits de dégradation sont retrouvés immédiatement après le volume de rétention de la colonne, ainsi que les acides aminés acides et neutres, les basiques étant élués bien après la tyrosine.

L'analyse par chromatographie sur papier (n-butanol - acide acétique - eau) des tubes correspondant à la DOPA montre que celle-ci est exempte d'autres acides aminés, alors que ceux correspondant à la tyrosine contiennent également la phénylalanine. La présence de cette dernière n'est cependant pas gênante pour le dosage de la tyrosine, soit par les réactions colorées spécifiques de la tyrosine, que ne donne pas la phénylalanine, soit par spectrophotométrie. Le maximum d'absorption dans l'ultraviolet de la tyrosine se situe en effet à 274,5 mµ et celui de la phénylalanine à 257,5 mµ ; de plus, en milieu neutre ou acide, le coefficient d'absorption moléculaire spécifique de la phénylalanine ($E.10^{-3} = 0{,}195$) est beaucoup plus faible que celui de la tyrosine ($E.10^{-3} = 1{,}34$). Il en résulte qu'aucune absorption à 275 mµ n'est en général décelable pour les quantités de phénylalanine habituellement rencontrées dans les protéines.

L'augmentation de la hauteur et du diamètre de la colonne permettent de séparer des quantités plus importantes de tyrosine et de DOPA : une colonne de $1{,}2 \times 120$ cm assure la séparation complète de 50 à 200 µg de DOPA et de 50 à 400 µg de tyrosine.

La vitesse d'écoulement peut varier dans d'assez larges limites (5 à 15 minutes par fraction de 2 ml) sans influer notablement sur la symétrie des pics et la séparation. Habituellement, le débit est réglé pour 5 à 8 minutes par fraction, ce qui permet de réaliser l'élution complète en 12 heures.

La quantité de DOPA retrouvée dépend de l'état de la résine. Lorsque celle-ci n'a subi qu'un cycle de régénération, la tyrosine est retrouvée entièrement (100 ± 5 p. cent) alors que les pertes en DOPA varient, selon les lots de résine, de 30 à 50 p. cent. Ces pertes diminuent au fur et à mesure des recyclages et disparaissent après une dizaine de régénérations de la résine (tableau II). On observe parallèlement une stabilisation de l'absorption de fond à une valeur basse (0,008 à 0,012 unité de densité optique).

Comme on pouvait penser que les pertes en DOPA étaient dues à des impuretés oxydantes contenues dans la résine, ou

TABLEAU II

Influence du traitement de la résine (Dowex 50) sur les taux de tyrosine et de DOPA retrouvées

	Tyrosine retrouvée (p. cent)	DOPA retrouvée (p. cent)
Résine fraîchement traitée	95	49
Résine fraîchement traitée, en présence d'acide ascorbique (*)	96	89
Résine fraîchement traitée, en présence de pyrogallol (**)	96	98
Résine après 4 générations	96	82
Résine après 10 générations	96	98

colonnes de 1,2 × 120 cm ; chromatographie d'une solution (4 ml) contenant 200 µg de tyrosine et 200 µg de DOPA.

(*) 100 mg pour 100 ml de résine.

(**) 20 mg pour 100 ml de résine.

adsorbées à la surface des grains, la résine neuve a été traitée par des réducteurs. Avec l'acide ascorbique (100 mg pour 100 ml de résine) on observe encore 10 à 15 p. cent de pertes, que l'on supprime complètement en traitant la résine par le pyrogallol (20 mg pour 100 ml de résine). Dans ces conditions, il faut augmenter le volume du tampon destiné à équilibrer la colonne jusqu'à obtenir un éluat incolore et n'absorbant plus à 275-280 mµ.

La méthode de séparation de la tyrosine et de la DOPA qui vient d'être décrite est applicable aux milieux biologiques qui contiennent ces deux acides aminés : elle peut être utilisée directement ou après purification préalable de l'extrait sur résines échangeuses d'ions. Elle est directement applicable aux hydrolysats protéiques susceptibles de contenir de la DOPA.

— *Le dosage de la tyrosine et de la DOPA* a été réalisé, dans les fractions collectées à partir de l'effluent de la colonne de chromatographie par spectrophotométrie, et par colorimétrie.

Pour le dosage par spectrophotométrie, chaque fraction (2 ml) était additionnée de 1 ml d'eau bidistillée. Les absorptions à 279 mµ (pour la DOPA) et à 275 mµ (pour la tyrosine) étaient déterminées (spectrophotomètre Beckman DU) en utilisant comme témoin de l'eau bidistillée. Elles étaient rapportées à une gamme-étalon de tyrosine et de DOPA réalisée entre 5 et 40 µg en utilisant pour dissoudre ces acides aminés la fraction de l'éluat de la colonne sortant après la tyrosine. L'absorption de fond était vérifiée avant et après les tubes choisis.

Ces déterminations spectrophotométriques ont été confirmées par l'utilisation de *dosages colorimétriques :* réaction à l'α-nitroso-β-naphtol pour la tyrosine, mise en œuvre selon Udenfriend et Cooper (95) et, pour la DOPA, réaction au nitrite-molybdate d'Arnow (96) modifiée en augmentant la concentration des réactifs, ce qui permet d'obtenir un accroissement relatif de la sensibilité. La prise d'essai (2 ml) est additionnée de 0,25 ml de HCl 2N et de 0,5 ml de solution de nitrite-molybdate à 20 p. cent. Après 2 à 3 minutes, on ajoute 0,3 ml de NaOH 2N. Le reste du dosage est effectué selon Arnow. La présence de tampon acétate d'ammonium jusqu'à une concentration 1 M ne gêne pas le dosage, à condition d'effectuer la gamme-étalon dans le même solvant et d'alcaliniser plus énergiquement (0,7 ml de NaOH 10N).

Pour le dosage de la tyrosine par l'α-nitroso-β-naphtol, les résultats sont parfaitement reproductibles pour des prises

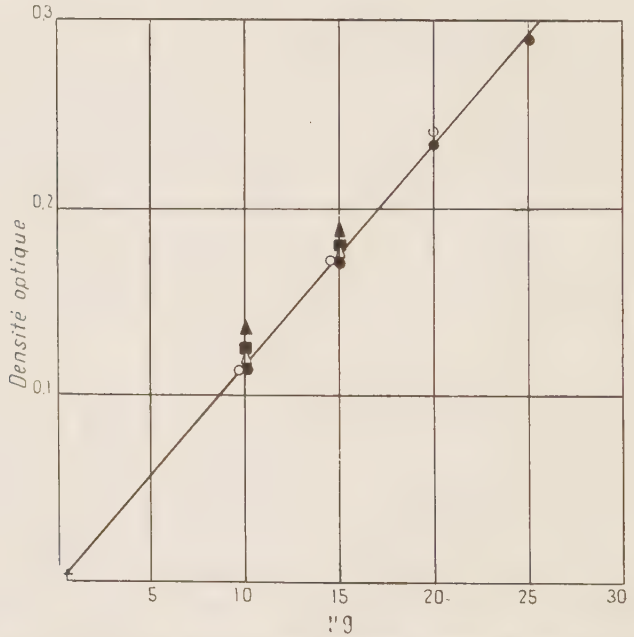


Fig. n° 4. — Courbe d'étalonnage obtenue dans le cas d'un dosage de tyrosine par la réaction à l'α-nitroso-β-naphtol.

Lectures de la densité optique au spectrophotomètre Beckman DU, en cuves de 1 cm et à 450 mμ. Prise d'essai = 2 ml.

. tyrosine seule (quantités en μg indiquées en abscisses).
Δ tyrosine + une quantité dix fois supérieure d'acide ascorbique.
■ tyrosine + une quantité vingt fois supérieure d'acide ascorbique.
\+ 200 μg d'acide ascorbique.
O tyrosine + des quantités inférieures ou égales de DOPA.
▲ tyrosine + une quantité trois fois supérieure de DOPA.

d'essai contenant 5 à 25 µg par ml. On a constaté également une bonne concordance avec le dosage spectrophotométrique après fractionnement. L'acide ascorbique éventuellement présent dans le milieu est sans influence, même pour une concentration dix fois supérieure à celle de la tyrosine. La DOPA est sans influence lorsqu'elle se trouve à un taux inférieur ou égal à celui de la tyrosine ; par contre, elle perturbe la réaction lorsque sa concentration est deux à trois fois plus forte que celle de la tyrosine (fig. 4). Ceci interdit donc le dosage de la tyrosine en présence de fortes quantités de DOPA, et oblige à effectuer dans ce cas un fractionnement préalable.

Pour la DOPA, les résultats obtenus en utilisant la réaction d'Arnow modifiée sont très reproductibles et concordent avec le dosage spectrophotométrique pour les quantités de DOPA habituellement utilisées (2,5 à 25 µg par prise d'essai). Le dosage ne peut pas être réalisé en présence d'acide ascorbique qui donne une coloration rose virant ultérieurement au jaune, mais

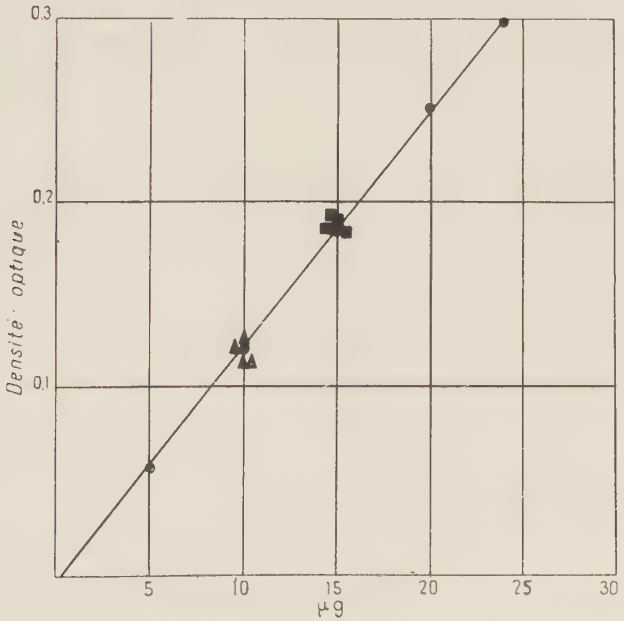


Fig. n° 5. — Courbe d'étalonnage obtenue dans le cas d'un dosage de DOPA par la réaction au nitrite-molybdate de sodium.

Réactions effectuées selon la méthode exposée dans le texte.

Lectures de la densité optique à 510 mµ, en cuves de 1 cm, au spectrophotomètre Beckman DU :

. DOPA seule (quantités en µg indiquées en abscisses).

▲ 10 µg de DOPA + 5, 10, 15 et 20 µg de tyrosine.

■ 15 µg de DOPA + 10, 20, 25 et 30 µg de tyrosine.

il peut être effectué en présence de tyrosine qui ne perturbe pas la réaction colorée (fig. 5).

Compte tenu de sa sensibilité, cette réaction peut être utilisée pour doser la DOPA, après fractionnement, sur l'ensemble des fractions la contenant.

G. - Chromatographie sur papier

Elle a été employée pour : 1) le contrôle de la séparation chromatographique sur colonne, 2) l'étude de la composition de certains milieux d'incubation et 3) la caractérisation et l'estimation des quantités de tyrosine et de DOPA trop faibles pour pour être séparées sur résine. Cette estimation a été effectuée soit de façon semi-quantitative par appréciation de la surface et de la coloration des taches obtenues avec la ninhydrine, en prenant comme référence une gamme-étalon réalisée sur la même feuille, soit selon Mortreuil et Khouvine (97).

Le solvant (n-butanol - acide acétique — eau (78 : 5 : 17), sur papier Whatman n° 1 ou 3 MM a été utilisé en une dimension, en technique descendante, ou combiné avec le solvant méthyléthylcétone - acide acétique - eau (75 : 25 : 30), en technique ascendante, en deux dimensions.

Les autoradiogrammes ont été obtenus avec des films sans écran (Kodak Kodirex).

La révélation à la ninhydrine (0,25 p. cent dans l'acétone) suivie de la stabilisation de la coloration violette obtenue par le nitrate de cuivre (98) permet de différencier la tyrosine de la DOPA : la coloration violette obtenue par la ninhydrine vire immédiatement au rose après pulvérisation du réactif au nitrate de cuivre dans le cas de la tyrosine, alors qu'elle reste violet-gris pendant 2 à 3 minutes avec la DOPA et ne vire au rose qu'après ce temps.

La tyrosine a été également révélée par l'α-nitroso-β-naphtol (99) qui donne une tache rose sur fond vert (1 µg) alors que l'acide ascorbique est révélé en jaune, ainsi que la DOPA pour des quantités plus fortes (4 à 5 µg).

Le réactif d'Arnow a été adapté à la révélation sur papier de la DOPA. Les solutions-stock suivantes sont préparées : solution 1 : nitrite de sodium 20 g, molybdate de sodium 20 g, pour 100 ml d'eau (réactif identique à celui utilisé pour les réactions en tubes ; se conserve 10 jours à + 2° C) ; solution 2 : HCl 2N ; solution 3 : NaOH 2N. Le réactif est préparé extemporanément en mélangeant dans l'ordre 0,5 ml de solution 1, 18,5 ml d'eau et 1 ml de solution 2. Le chromatogramme est pulvérisé légèrement avec ce réactif et séché sous un courant d'air froid ou à l'étuve à 50-60° C, puis on pulvérise la solution 3. Les orthodiphénols se révèlent en rose (sensible à 0,25 µg pour la DOPA), l'acide ascorbique en rouge-brun et la tyrosine en

jaune pour une quantité minimum de 5 µg. Les taches d'orthodiphénols pâlissent avec le temps et virent au jaune-orangé. Elles redeviennent roses par une nouvelle pulvérisation de NaOH 2N.

H. - **Hydrolyses des protéines**

Elles ont été réalisées en tubes scellés sous vide avec un dispositif permettant une agitation par rotation continue des tubes dans une étuve réglée à 110° C en utilisant, selon les cas, les agents d'hydrolyse suivants : 1) HCl 6N (deux fois redistillé) avec ou sans addition de composés réducteurs (acide ascorbique) ; 2) HCOOH 5 à 15N ; 3) H.COOH 0,5 à 15N en présence de Dowex 50 ; 4) H.COOH 85 p. cent et HCl 2N selon GURNANI et coll. (100).

L'hydrolyse par HCl 6N (24 heures) a été utilisée de façon habituelle pour les différentes protéines analysées. Toutefois, l'étude de la formation éventuelle de restes de DOPA par oxydation des restes de tyrosine des chaînes polypeptidiques a rendu nécessaires l'utilisation ou la mise au point d'autres méthodes d'hydrolyse respectant, au moins partiellement, la DOPA, acide aminé orthodiphénolique particulièrement sensible aux agents d'oxydation.

Des essais préliminaires avaient montré en effet que l'addition de DOPA libre à des milieux d'hydrolyse chlorhydrique de différentes protéines se solde par sa destruction totale (tableau III), quelle que soit la concentration en HCl utilisée (2 à 6N).

TABLEAU III

Destruction de la DOPA libre ajoutée à des milieux d'hydrolyse chlorhydrique de protéines

Nature des composés soumis à l'hydrolyse (*)	DOPA retrouvée (**)
DOPA : 200 µg HCl 6N : 0,5 ml	Traces (non dosable)
DOPA : 200 µg Gélatine : 10 mg HCl 6N : 1,5 ml	0
DOPA : 200 µg Ribonucléase : 5 mg HCl 6N : 1,5 ml	0
DOPA : 200 µg Globine. (cheval) : 5 mg HCl 6N : 1,5 ml	0

(*) 24 heures à 110° C, en tubes scellés sous vide.

(**) Recherchée par la réaction au nitrite-molybdate de sodium d'Arnow.

L'addition d'acide ascorbique au milieu d'hydrolyse protège la DOPA dans une certaine mesure (tableau IV) mais n'empêche pas une destruction de l'ordre de 50 p. cent de la quantité initiale, dans les conditions étudiées.

TABLEAU IV

Influence de l'addition d'acide ascorbique sur le taux de DOPA retrouvée après hydrolyse de ribonucléase en présence de cet acide aminé

Quantité d'acide ascorbique ajoutée (µg)	DOPA retrouvée (p. cent)
50	49
100	49
200	43
400	38

Le milieu soumis à l'hydrolyse était constitué de 5 mg de ribonucléase, 200 µg de DOPA, 1,5 ml de HCl 6N et de quantités variables d'acide L-ascorbique.

La DOPA a été dosée dans l'hydrolysat (nitrite-molybdate de sodium) après élimination de l'acide ascorbique et de ses produits de dégradation par fixation des acides aminés sur Dowex 50, lavage à l'eau et élution de ceux-ci avec l'acétate d'ammonium 1 M à pH = 6,0.

La diminution du taux de DOPA retrouvée pour 200 et 400 µg d'acide ascorbique peut être interprétée comme une destruction secondaire de la DOPA, liée aux propriétés oxydantes des produits d'oxydation de l'acide ascorbique.

L'acide formique (connu pour ses propriétés réductrices), employé comme seul agent d'hydrolyse conduit, dans le cas de la ribonucléase, à une rupture seulement partielle des liaisons peptidiques (*). A la suite des observations de DEATHERAGE et coll. (101-103) sur l'hydrolyse des protéines en présence de résines échangeuses d'ions, nous avons mis au point une méthode utilisant l'acide formique en présence de Dowex 50. La technique standard adoptée — qui correspond aux conditions optimum définies par un grand nombre d'essais préliminaires — est la suivante : on place dans un tube à sceller 6 à 12 mg de la protéine et 50 à 400 µg de DOPA (amenées en solution dans un volume d'eau aussi faible que possible), 1 g de Dowex 50 X 4 sous forme H^+, préalablement séché à l'étuve à 37° C pendant 15 heures, et on porte le volume total à 1,5 ml avec H.COOH pur pour obtenir une concentration finale 5N. Le tube est scellé sous vide et placé pendant 24 heures dans une étuve réglée à 110° C, munie d'un dispositif permettant une agitation rotative continue du tube.

(*) Cette partie du travail ayant été réalisée avant l'utilisation de l'Auto-Analyzer, le degré d'hydrolyse pour les méthodes autres que l'hydrolyse chlorhydrique n'a été vérifié qu'en ce qui concerne la libération de la tyrosine.

Au bout de ce temps, son contenu est versé dans une colonne de 1 × 10 cm. La résine, qui a fixé les acides aminés libérés par l'hydrolyse, est lavée à l'eau bidistillée, pour éliminer l'acide formique, jusqu'à ce que l'effluent ait atteint pH = 6, puis éluée par 12 ml de tampon acétate d'ammonium 1 M, de pH = 6,0. L'éluat, qui contient la tyrosine et la DOPA, est alors fractionné sur colonne dans les conditions décrites précédemment ou analysé directement par les réactions à l'α-nitroso-β-naphtol et au nitrite-molybdate de sodium pour déterminer son contenu en tyrosine et en DOPA. Dans ces conditions, on retrouve 5 restes de tyrosine sur les 6 que contient la ribonucléase et 45 à 68 p. cent (moyenne 55 p. cent) de la DOPA ajoutée. Le sixième reste de tyrosine fait partie d'un peptide non élué de la résine dans les conditions utilisées.

Les résultats sont très reproductibles à condition d'utiliser une résine ayant subi de nombreux recyclages à chaud. L'addition de pyrogallol, d'hydroquinone ou d'acide ascorbique ne modifie pas sensiblement le taux de DOPA retrouvée. Cette technique, appliquée à l'hydrolyse de la ribonucléase performique dans laquelle tous les restes de tyrosine ont été oxydés en restes de DOPA (DOPA-ribonucléase performique) a permis le dosage effectif de 3,5 restes de DOPA sur les 6 que devait contenir la molécule. Compte tenu du rendement de 55 p. cent de la méthode d'hydrolyse, ce dosage constitue une preuve supplémentaire de la transformation des 6 restes de tyrosine en DOPA (les données concernant les DOPA-protéines seront développées ultérieurement).

L'utilisation des DOPA-protéines a permis également d'autres constatations : l'hydrolyse par HCl 6N pendant 24 heures à 110° C ne s'accompagne pas d'une destruction importante de DOPA, dont on peut doser 73 p. cent de la quantité théorique calculée, alors que 63 p. cent sont retrouvés après hydrolyse formique et 70 p. cent après hydrolyse HCl - H.COOH selon Gurnani et coll. (100). Des constatations analogues ont été faites pour la DOPA-α-lactalbumine (tableau V, page suivante).

La présence de DOPA dans les hydrolysats chlorhydriques de DOPA-protéines, surprenante au premier abord, a été démontrée par la caractérisation indiscutable de cet acide aminé grâce aux critères suivants : 1) au cours des fractionnements chromatographiques sur Dowex 50, il est élué en même position que la DOPA par rapport à la tyrosine ; 2) les fractions qui lui correspondent présentent un spectre d'absorption dans l'ultraviolet identique à celui de la DOPA (λ max. = 279 mμ) ; 3) il donne une réaction d'Arnow positive ; 4) il est oxydable par la polyphénoloxydase ; 5) après chromatographie sur papier en deux dimensions, il donne avec les réactifs suivants des taches superposables avec la tache témoin de [^{14}C]-DOPA, sur

TABLEAU V

Nature de l'hydrolyse	Pourcentage de DOPA retrouvée par rapport à la quantité de DOPA théorique déduite de la tyrosine disparue.	
	DOPA-ribonucléase performique (*)	DOPA α-lactalbumine (**)
HCl 6N	73	57
H.COOH 5N+Dowex 50 ...	63	70
H.COOH 85 p. 100 HCl 2N .	70	—

(*) Six restes de tyrosine disparus après oxydation par la polyphénol-oxydase.

(**) Trois restes de tyrosine disparus après oxydation par la polyphénol-oxydase.

Conditions d'oxydation des substrats : incubation en tampon phosphate 0,1 M, pH = 6,8 ; 100 agitations/minute dans l'appareil de Warburg.

Les milieux contenaient de 6 à 12 mg de protéines, de 0,040 à 0,060 ml d'enzyme (1 ml contient 13 mg de protéines et 57.500 unités Hogeboom Adams) et 30 moles d'acide ascorbique par reste de tyrosine présent dans le substrat. Durée des incubations : 30 minutes environ. Hydrolyses effectuées sur le résidu sec (dessiccation sous vide sur anhydride phosphorique) des milieux d'incubation dialysés 36 h. à +2° C contre de l'eau bidistillée renouvelée fréquemment.

autoradiogramme : réactif d'Arnow sur papier, nitrate d'argent ammoniacal, polyphénoloxydase et ninhydrine (avec un comportement analogue à celui de la DOPA après pulvérisation du réactif au nitrate de cuivre). Ces mêmes critères ont également été vérifiés pour la caractérisation de la DOPA libérée après l'hydrolyse de DOPA-protéines au moyen de H.COOH et Dowex 50.

Ces faits démontrent une stabilisation de la DOPA vis-à-vis du chauffage en présence de HCl, lorsqu'elle est incluse dans une chaîne polypeptidique. Ils peuvent être interprétés en admettant que la DOPA est plus sensible à l'action oxydante du milieu lorsqu'elle se trouve à l'état libre, et qu'au cours de l'hydrolyse, elle n'est libérée qu'assez tardivement, ce qui la préserve en partie.

Enfin l'influence du pouvoir oxydant du milieu d'hydrolyse sur la destruction de la DOPA est mise en évidence par une disparition plus importante de celle-ci dans les hydrolysats de DOPA-α-lactalbumine (dosage de 57 p. cent de la quantité initiale) que dans ceux de DOPA-ribonucléase performique (dosage de 73 p. cent de la quantité initiale). On peut penser que la présence des produits de dégradation du tryptophane contenu dans l'α-lactalbumine confère aux milieux d'hydrolyse de la DOPA-α-lactalbumine des propriétés oxydantes plus accusées.

I. — La séparation des peptides obtenus après digestion par la trypsine et la chymotrypsine (cristallisées, Worthington) de différentes protéines a été réalisée par *chromatographie et électrophorèse en deux dimensions* selon la méthode des « fingerprints » décrite par Katz et coll. (104).

Les conditions expérimentales adoptées sont les suivantes :

— *La digestion des protéines* est réalisée dans une solution de NH_4HCO_3 0,1 M, de pH = 8,5 (habituellement 1,3 ml pour 10 mg de protéine) en présence d'une goutte de solution de rouge de phénol (*) (permettant de vérifier qu'aucun abaissement du pH ne se produit au cours de la digestion) et de 0,035 ml d'une solution de trypsine à 2 mg par ml (rapport enzyme : substrat = 0,7 p. cent). Le milieu est placé dans une étuve réglée à 37° C, pendant 120 minutes. Au bout de ce temps, on ajoute 0,035 ml d'une solution de chymotrypsine à 2 mg par ml (rapport enzyme : substrat = 0,7 p. cent) et on laisse à nouveau l'incubation se poursuivre 120 minutes à 37° C. A la fin de la digestion, le milieu est lyophilisé (12 à 24 heures sont nécessaires pour l'élimination de l'eau et des sels avec l'appareil « Speedivac » centrifugal freeze dryer, modèle 30 P, Edwards High Vacuum Ltd, Crawley, Angleterre) et le lyophilisat repris par 0,5 ml d'eau.

— *La chromatographie* est effectuée sur papier Whatman n° 3 MM avec le solvant n-butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5), en technique descendante. Une meilleure reproductibilité des migrations est obtenue en préparant un solvant frais avant chaque expérience : après mélange des constituants dans une ampoule à décanter et agitation, le solvant est abandonné pendant quelques heures dans la pièce où s'effectuera la chromatographie, pour permettre le déphasage : la phase inférieure, aqueuse, est utilisée pour saturer la cuve et la phase supérieure, butanolique, est transvasée dans l'augette. Des dépôts de 100 µl sont effectués (zone A sur la fig. 6), correspondant à 2 mg de protéine initiale. Le chromatogramme est développé pendant 22 heures environ. Pour obtenir des migrations comparatives et éliminer les facteurs influant sur les vitesses de migration (comme les variations de température ambiante, le remplissage de l'augette ou le degré de saturation de la cuve), la chromatographie est arrêtée lorsque la tache (jaune) de rouge de phénol atteint un repère préalablement marqué aux deux tiers de la feuille dans le sens de la chromatographie (voir fig. 6). Dans ces conditions, aucun peptide ou acide aminé ne dépasse le front de la feuille.

(*) ... préparée en dissolvant 40 mg de rouge de phénol dans 11,3 ml de NaOH N/100, puis en complétant à 100 ml avec de l'eau.

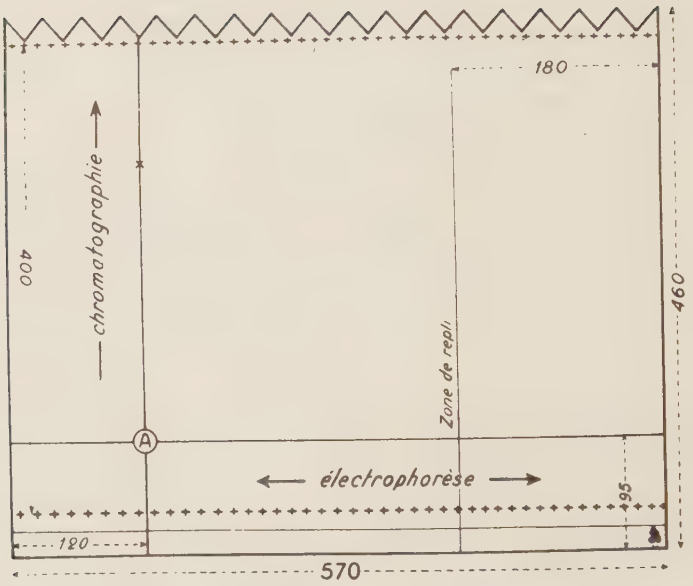


FIG. N° 6. — Schéma indiquant la préparation de la feuille (papier Whatman n° 3 MM) pour la séparation des peptides par chromato-électrophorèse. Les cotes sont données en millimètres.

Ⓐ zone de dépôt de l'échantillon.

+ + + lignes suivant lesquelles est découpée la feuille après la chromatographie et avant sa mise en place sur le chevalet d'électrophorèse.

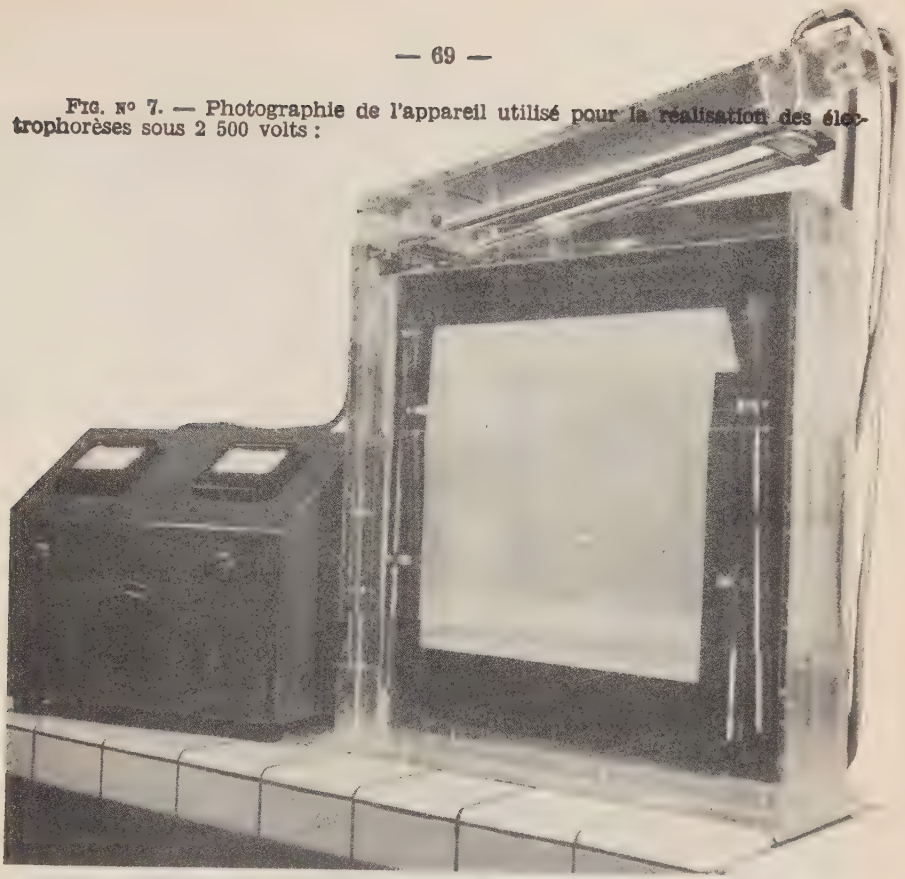
× point situé aux 2/3 de la feuille dans le sens de la chromatographie, servant de repère pour la migration de la tache de rouge de phénol.

— *Les migrations électrophorétiques* sont réalisées dans un appareil construit au laboratoire, d'après les plans fournis par la section technique du National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, U.S.A.) (fig. 7). Elles sont réalisées en tampon pyridine - acide acétique - eau (1 : 10 : 289) de pH = 3,6.

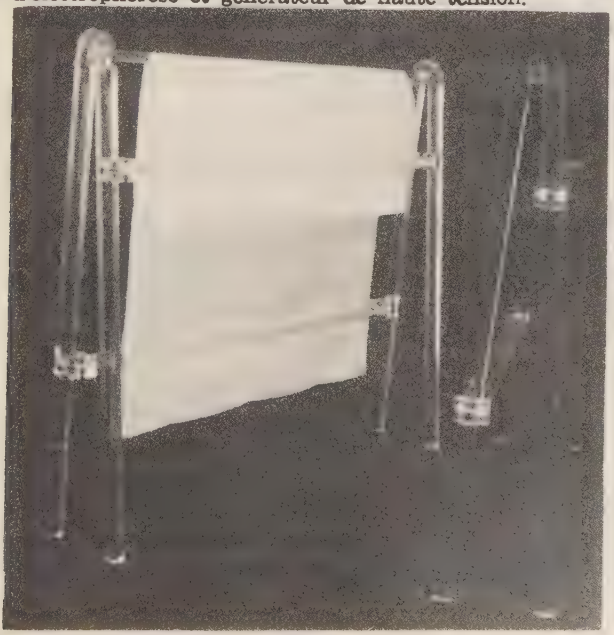
La cuve est remplie, au-dessus des niveaux du tampon, avec de la Dilutine 140 (éther de pétrole léger, point éclair 70° C, fourni par les Etablissements Shell-Berre) qui joue les rôles d'isolant électrique, de volant thermique et d'échangeur de température avec une source froide constituée par un serpentin réfrigérant (fixé sous le couvercle de la cuve) dans lequel circule un courant d'eau. Elle prévient également la dessication de la feuille.

Après migration, le chromatogramme est séché sous une hotte à circulation d'air. Lorsque l'odeur de l'acide acétique du solvant n'est plus perceptible, la feuille est découpée (fig. 6) à

FIG. N° 7. — Photographie de l'appareil utilisé pour la réalisation des électrophorèses sous 2 500 volts :



A) cuve d'électrophorèse et générateur de haute tension.



B) chevalets sur lesquels sont fixées les feuilles.

une largeur de 40 cm, placée sur le chevalet (fig. 7 *b*) et imbibée de tampon. L'imbibition par le tampon pyridine-acide acétique-eau est réalisée au moyen d'un pulvérisateur, en commençant par la zone de repli. La ligne correspondant à la migration des peptides, dans le sens de la chromatographie, n'est pas directement soumise à la pulvérisation pour éviter les coulures et la diffusion des taches, mais on laisse le papier s'imbiber par capillarité après l'avoir mouillé de part et d'autre de cette zone. Ceci permet d'obtenir des taches plus ramassées sur la ligne de départ de l'électrophorèse. A la fin de cette opération, le papier doit être mouillé de façon uniforme pour éviter des perturbations dans la migration.

Le chevalet, sur lequel est fixée la feuille, est alors placé dans la cuve et on laisse la migration s'effectuer pendant 90 minutes sous une différence de potentiel de 2.500 volts pour 57 cm, fournie par un générateur pouvant débiter 3.000 volts sous 150 milliampères. L'intensité correspondante, pour une largeur de feuille de 40 cm est de 120 mA, soit 3 mA par cm. Une fois la migration terminée, la feuille est séchée dans les mêmes conditions que précédemment et la révélation des peptides est effectuée par le réactif à la ninhydrine (0,25 p. cent dans l'acétone).

Dans tous les cas où elle a été utilisée, cette technique a donné des résultats parfaitement homogènes et reproductibles. Elle permet également la séparation qualitative de presque tous les acides aminés contenus dans les hydrolysats de protéines (fig. 8) et a été utilisée à cette fin au cours de certaines expériences.

J. - Expériences de sédimentation

Elles ont été réalisées en collaboration avec le Docteur J. Reynaud, dans une ultracentrifugeuse Spinco, modèle E.

Les constantes de sédimentation ont été déterminées par la méthode des logarithmes, en utilisant une cellule à frontière préformée, à 59.780 tours par minute. Différentes concentrations ont été utilisées dans chaque série d'expériences pour obtenir la constante de sédimentation à une dilution infinie.

La détermination des concentrations exactes des solutions protéiques utilisées pour cette étude (et également pour le calcul des coefficients d'absorption) a été réalisée par réfractométrie, en admettant un incrément de réfraction $\Delta_n = 1{,}86.10^{-3}$ par gramme pour 100 ml.

Les valeurs obtenues (tableau XV, p. 126) sont exprimées en unités Svedberg (sec. $\times 10^{-13}$).

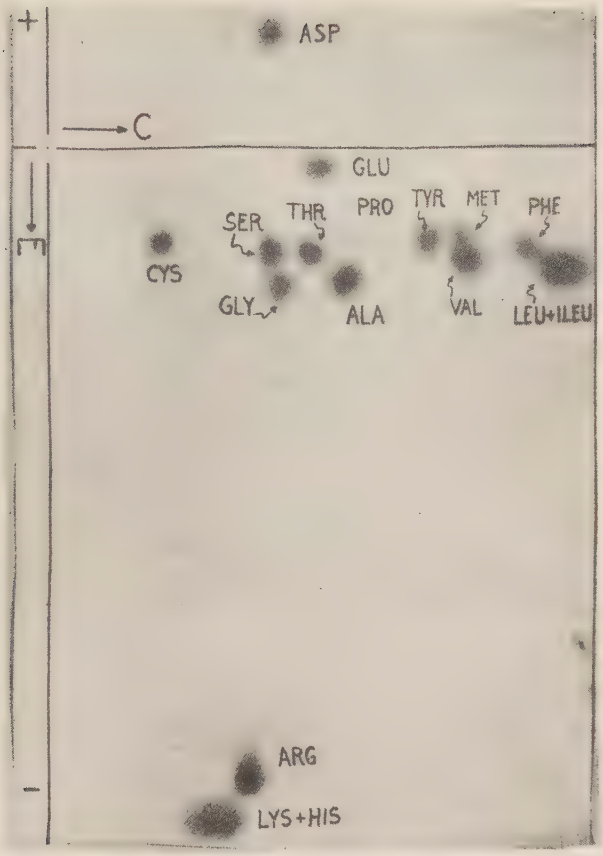


FIG. N° 8. — Photographie d'une séparation par chromatographie-électrophorèse des acides aminés contenus dans un mélange témoin.

Conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour la séparation des peptides (voir texte). Le dépôt à analyser était constitué de 15 microlitres d'un mélange étalon d'acides aminés (Beckman) contenant 2,5 micromoles par millilitre.

Les poids moléculaires (M) ont été déterminés par la méthode d'équilibre de sédimentation approché (méthode d'Archibald) (105) selon l'équation :

$$M = \frac{RT}{(1 - \overline{\nu}\varrho)\,\omega^2} \cdot \frac{\frac{dc}{dx}}{x_{m\ ou\ b}\ c_{m\ ou\ b}}$$

où T = température absolue.
R = constante des gaz parfaits ($8{,}314 . 10^7$ ergs/mole/degré).
ϱ = densité de la solution protéique.
ω = vitesse angulaire du rotor.

Les vitesses de rotation suivantes ont été utilisées : 11.573 tours par minute pour les ribonucléases native et performique et 5.563 tours par minute pour la ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ.

Le volume spécifique partiel $\overline{v}$ a été déterminé par picnométrie. Les concentrations protéiques au ménisque (C_m) et au bas de cellule (C_b) ont été calculées par intégration des gradients de haut (de x_m à X_1) et de bas de cellule (de X_2 à x_b) de part et d'autre de la région plateau (de X_1 à X_2) (voir fig. 9) d'après l'équation de KLAINER et KEGELES (106).

$$C_{m\ ou\ b} = C_o \pm \frac{1}{x^2_{m\ ou\ b}} \int_{x_m \text{ ou } X_2}^{X_1 \text{ ou } x_b} x^2 \left(\frac{dc}{dx}\right) dx$$

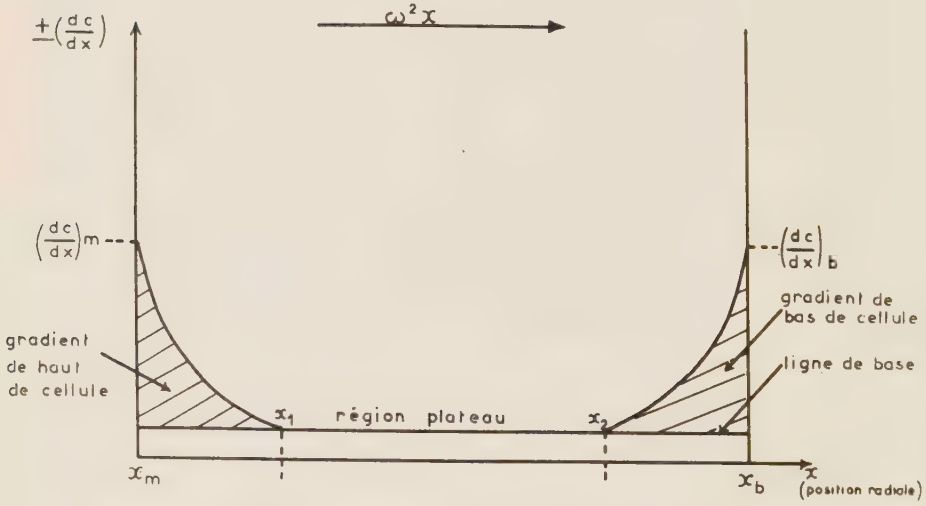


FIG. N° 9. — Diagramme d'ultracentrifugation à l'approche de l'équilibre de sédimentation.

On trouvera dans le tableau VI un exemple d'éléments de calcul pour la détermination de M par intégration du gradient de concentration de haut de cellule pour chaque type de ribonucléase considérée.

Les valeurs données ici pour M représentent les chiffres moyens calculés pour chaque type de ribonucléase à partir de 12 déterminations effectuées en fonction du temps à partir des gradients de haut et de bas de cellule. Parmi ces 12 déterminations, nous avons choisi comme exemple dans les trois cas l'une d'elles qui aboutit à cette même valeur moyenne.

TABLEAU VI

	T (°C + 273)	$\bar{\nu}$ (ml. g^{-1})	ω rad/ seconde	ρ (g. ml^{-1})	$\frac{RT}{(1-\bar{\nu}\rho)\omega^2}$	dx (cm)	dc/dx (cm)	x_m (cm)	C_m (cm^2)	M (g)
Ribonucléase native (exp. n° 1036)	293	0,709	1211,9	1,0262	$6,088.10^4$	0,0050	4,23	5,995	3,168	13.700
Ribonucléase performique (exp. n° 1050)	293	0,6	1211,9	1,0146	$4,238.10^4$	0,0039	3,57	5,887	1,975	13.000
Ribonucléase performique oxydée (exp. n° 1051)	293	0,6	582,6	1,0146	$18,290.10^4$	0,0020	4,26	5,903	2,000	66.000

PREMIERE PARTIE

OXYDATION DE LA TYROSINE ET DE PEPTIDES LA CONTENANT EN L'ABSENCE ET EN PRÉSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE

Au cours du rappel des principales théories concernant le mécanisme d'action de la polyphénoloxydase, nous avons vu que divers arguments théoriques et expérimentaux ont permis de considérer la DOPA-quinone comme un intermédiaire dans la chaîne des réactions d'oxydation conduisant à la formation de mélanines à partir de la tyrosine. Quel que soit le mécanisme qui permet l'hydroxylation du monohydroxyphénol, celui-ci devrait être transformé en l'orthodihydroxyphénol correspondant, puis en orthoquinone. Cependant, le caractère d'intermédiaire unique de la DOPA-quinone dans l'oxydation de la tyrosine en mélanines par la polyphénoloxydase n'a pas encore été démontré expérimentalement.

Dans cette partie du travail, mettant à profit la propriété que possède l'acide ascorbique, lorsqu'il est en excès dans le milieu d'incubation, de bloquer la mélanogénèse au stade de la DOPA-quinone en réduisant cette dernière en DOPA, au fur et à mesure de sa formation, nous avons pu apporter des preuves chimiques directes en faveur de la transformation quantitative de la tyrosine en DOPA-quinone. L'action réductrice de l'acide ascorbique considérée ici est par ailleurs indépendante de son mode d'action possible comme agent d'hydroxylation de la tyrosine en DOPA, dont le mécanisme sera discuté à la fin de ce chapitre.

Nous avions signalé également que la théorie non enzymatique indirecte dite « théorie de l'orthoquinone » (équation [6], p. 18) qui permet seule d'expliquer de façon satisfaisante la présence de DOPA dans le milieu d'incubation pose le problème de l'existence ou de la formation dans le milieu des premières molécules de cet orthodiphénol, nécessaires à l'initiation de l'oxydation de la tyrosine. On peut penser, étant donné la faible quantité d'orthodihydroxyphénol nécessaire, que toute solution de monohydroxyphénol en contient des traces suffisantes pour initier la réaction, ces traces pouvant avoir pris naissance sous l'effet de causes diverses, comme des radiations ionisantes ou des actions photochimiques. Nous avons cepen-

dant pu montrer que la polyphénoloxydase contient tous les éléments nécessaires à la réalisation d'un système non enzymatique permettant l'hydroxylation de la tyrosine en DOPA. La formation de DOPA à partir de tyrosine dans de telles conditions pourrait constituer un des mécanismes possibles de l'initiation des réactions d'oxydation des monophénols par la polyphénoloxydase, en l'absence de réducteurs. Il n'est pas exclu par ailleurs, malgré l'existence dans certains tissus d'enzymes d'oxydation capables de transformer la tyrosine en DOPA, qu'un tel mécanisme puisse avoir lieu *in vivo*.

RESULTATS

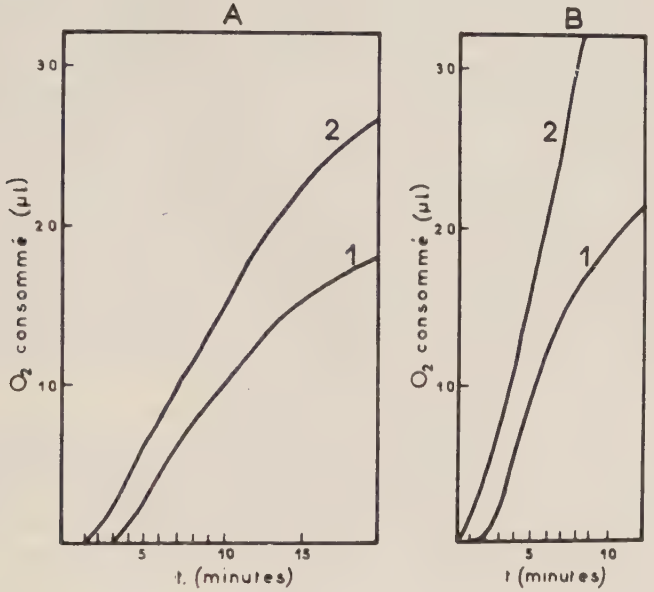
1° Hydroxylation de la tyrosine par un système enzymatique faisant intervenir les constituants de la polyphénoloxydase

Divers auteurs, parmi lesquels Krueger (107) et Kertesz (43) ont suggéré que les premières molécules de DOPA formées au sein d'un milieu d'incubation contenant de la tyrosine soumise à l'action de la polyphénoloxydase pourraient prendre naissance sous l'influence d'un système d'hydroxylation non spécifique de type « réducteur - ions métalliques - oxygène ». Ce système serait constitué par les éléments mêmes de la polyphénoloxydase, les ions métalliques étant représentés par le cuivre contenu dans la molécule et la protéine jouant le rôle à la fois de réducteur (éventuellement par ses groupements thiols) et d'agent chélatant (propriété liée à une structure particulière permettant la fixation du cuivre). Le temps de latence précédant l'apparition des phénomènes visibles (coloration du milieu et début de la consommation d'oxygène) observés au cours de l'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase, pourrait être interprété comme la période pendant laquelle : *a*) les premières molécules de DOPA permettant l'initiation de la réaction se forment par ce mécanisme et (ou) *b*) les molécules d'orthodihydroxyphénol préexistantes ou ainsi formées se multiplient jusqu'à atteindre un taux suffisant pour que les phénomènes engendrés par la réaction deviennent perceptibles. Il est à noter en effet que l'addition d'orthodihydroxyphénol au milieu raccourcit considérablement ou même supprime le temps de latence.

Différents arguments expérimentaux permettent de conclure que le mécanisme évoqué ci-dessus est possible.

La figure 10 montre que la préincubation d'une solution de tyrosine en présence de polyphénoloxydase inactivée par la chaleur (et ne présentant, même utilisée à de fortes concentrations, plus aucune activité enzymatique sur la DOPA) réduit fortement (PPO-L et PPO-W) ou même supprime (PPO-KZ) le temps de latence précédant la consommation d'oxygène lors-

qu'une solution active de PPO-KZ est ultérieurement ajoutée au milieu.



(A) (B)

FIG. N° 10. — Etude de la consommation d'oxygène dans les premiers temps de l'oxydation de la tyrosine par la PPO-KZ. Les courbes (2) représentent la consommation d'oxygène de solutions de tyrosine ayant été préincubées avec des enzymes inactivés par la chaleur (A = PPO-L ; B = PPO-KZ) ; les courbes (1), celles des solutions témoins, préincubées dans les mêmes conditions, mais sans enzyme inactivé.

Conditions expérimentales : incubations conduites dans des « fioles de Warburg magnétiques » (permettant d'effectuer des mesures très rapidement après la mise en route de la réaction).

— *Les expériences correspondant à A* ont été réalisées en faisant préincuber dans les fioles pendant 45 minutes à 37° C et avec une agitation de 100 rotations par minute, les milieux suivants :

(1) L.-tyrosine 400 µg/ml : 3 ml — eau : 2 ml.

(2) L-tyrosine 400 µg/ml : 3 ml — eau : 1,5 ml — PPO-L inactivée par un chauffage de 20 min. au bain-marie à 100° C : 1,5 mg dans 0,5 ml.

A la fin du temps de préincubation, l'enzyme actif (0,010 ml de PPO-KZ diluée au 1/10) contenu dans une coupelle magnétique est mélangé aux milieux et les quantités d'oxygène consommé sont lues à des temps aussi rapprochés que possible.

— *Les expériences correspondant à B* ont été réalisées dans des conditions analogues, mais la préincubation a été conduite dans (2) en présence d'une quantité d'enzyme inactivé (PPO-KZ) correspondant à 0,030 ml de la solution enzymatique initiale. L'inactivation de la PPO-KZ a été obtenue par chauffage de la solution enzymatique diluée pendant 10 minutes au bain-marie à 80° C sous agitation mécanique intense, permettant d'éviter la précipitation de la protéine au cours du chauffage (ailette de verre tournant rapidement dans la solution).

Des résultats similaires ont été obtenus avec des temps de préincubation variant entre 7 et 60 minutes. La PPO-W conduit à des résultats identiques à ceux obtenus avec la PPO-L.

Ces faits peuvent être interprétés comme le résultat de la formation dans le milieu d'une petite quantité de DOPA à partir de la tyrosine soumise à la préincubation. La preuve en a été apportée par la mise en évidence directe de la DOPA formée au moyen d'expériences utilisant de la tyrosine marquée par [^{14}C] : la chromatographie sur papier d'une partie aliquote du milieu de préincubation, suivie d'une autoradiographie a montré, même après des temps courts de préincubation (de l'ordre de 1 minute) la présence d'une tache dont l'emplacement correspond à celui de la DOPA. Dans les témoins, préincubés de façon identique mais en l'absence d'enzyme inactivé, aucune trace de DOPA n'a été trouvée. La quantité de DOPA formée, relativement faible par rapport à la tyrosine présente, est augmentée fortement par l'addition au milieu d'acide ascorbique (4 moles par mole de tyrosine) ou de traces d'ions cuivriques (amenés sous forme de $CuSO_4$).

La préincubation de la tyrosine en l'absence de polyphénoloxydase inactivée nécessite, pour obtenir une formation de DOPA, la présence dans le milieu à la fois d'acide ascorbique et d'ions cuivriques ; la présence supplémentaire d'une protéine non spécifique (sérumalbumine) n'augmente pas la quantité de DOPA formée, elle semble au contraire provoquer une légère diminution.

Ces observations permettent de conclure que la formation de faibles quantités de DOPA à partir de la tyrosine est possible, dans le milieu, par un mécanisme non enzymatique. L'inefficacité, en tant que système d'hydroxylation, des ions métalliques associés à une protéine non spécifique (sérumalbumine) met en outre l'accent sur le rôle joué par l'apoenzyme de la polyphénoloxydase, même après dénaturation par la chaleur.

2° Influence de l'acide ascorbique sur la composition des milieux au cours de l'oxydation de la tyrosine et de peptides la contenant

Les milieux d'incubation utilisés au cours de ces expériences avaient en général la composition suivante : substrat (tyrosine, glycyltyrosine, leucyltyrosine, glycyltyrosine-éthylester, leucyltyrosine-éthylester, thyronine) : 1 ml de solution $2{,}25.10^{-3}$M ; polyphénoloxydase = 0,004 à 0,020 ml ; éventuellement acide ascorbique (dont la solution a été neutralisée à pH = 6,8 par NaOH 1N) 10 à 40 moles par mole de substrat, dans un volume total de 4 ml. Agitation douce continuelle des tubes à 20° C. En fin d'expérience, ou à des intervalles de temps déterminés et après inactivation de l'enzyme, la composition des milieux a été étudiée par chromatographie sur papier (cf. Matériel et Méthodes).

L'oxydation d'un monophénol ou d'un orthodiphénol par la polyphénoloxydase s'accompagne, plus ou moins rapidement

selon la structure du substrat, de l'apparition dans le milieu d'incubation d'une coloration jaune-orangée ou rose, puis orangée ou rouge, due à la formation de pigments. Quand la fonction aminée de la tyrosine est incluse dans une liaison peptidique, la couleur initiale est jaune, puis vire à l'orangé, ce qui paraît traduire une accumulation temporaire de l'ortho-quinone par impossibilité de cyclisation de la chaîne latérale.

Dans le cas de l'oxydation en présence d'acide ascorbique, le milieu reste incolore pendant un temps variable (qui est fonction du rapport moles d'acide ascorbique par mole de substrat, de la quantité d'enzyme utilisée, de la nature du substrat, du pH du milieu et de la température) puis se teinte en jaune-paille. Cette coloration augmente progressivement en intensité puis vire assez brusquement à l'orangé ou au rouge après une brève phase jaune d'or.

Pendant la phase initiale de l'oxydation de la tyrosine en présence d'acide ascorbique, les seuls composés détectables par chromatographie tant que le milieu reste incolore sont la tyrosine et la DOPA (fig. 11).

L'identification et le dosage des constituants du milieu ont été réalisés selon les techniques décrites précédemment. La somme de la DOPA (ramenée en équivalent de tyrosine) et de la tyrosine restante (lorsqu'il en reste) équivaut à 95 à 100 p. cent de la quantité de tyrosine initialement présente.

Quelques instants (5 à 20 secondes) avant le virage au jaune du milieu apparaît un composé (X), de Rf intermédiaire entre 0 et celui de la DOPA en butanol acétique, coloré en violet par la ninhydrine (et présentant des caractères analogues à ceux de la DOPA après pulvérisation au nitrate de cuivre) donnant mais faiblement la réaction d'Arnow et réduisant le nitrate d'argent ammoniacal. Son taux augmente pendant que la couleur jaune se développe ; il n'est pas modifié par addition d'une nouvelle quantité d'acide ascorbique.

Un composé présentant un Rf et des réactions colorées identiques a également été mis en évidence au cours de l'oxydation de la DOPA par la polyphénoloxydase en présence d'acide ascorbique et au cours des oxydations de tyrosine et de DOPA en l'absence d'acide ascorbique. Dans ce dernier cas cependant, son taux est beaucoup plus faible.

Presque simultanément apparaît une tache Y, de Rf = 0 superposable à la tache de pigments rencontrée dans les incubations en l'absence de réducteur. L'utilisation de [^{14}C]tyrosine permet d'affirmer que X et Y sont bien des dérivés de la tyrosine (fig. 11). La diminution du taux de tyrosine dans le milieu

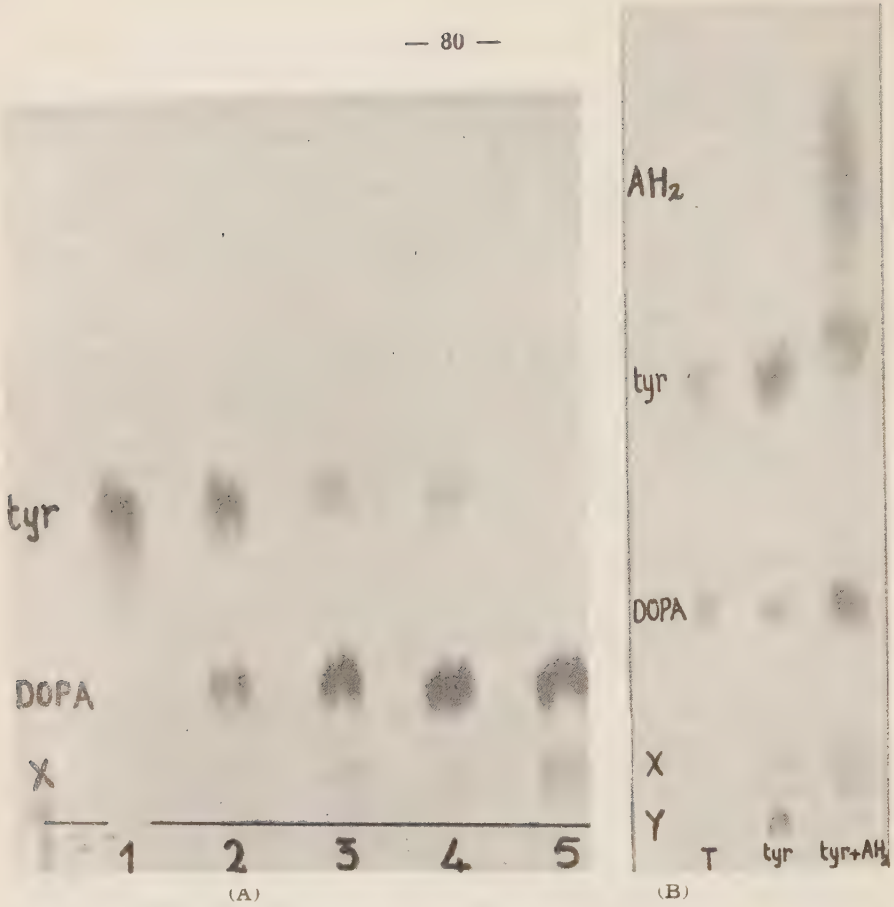


FIG N° 11. — A. - Autoradiographie d'un chromatogramme montrant la composition du milieu d'incubation au cours de l'oxydation par la polyphénol-oxydase (0,010 ml/ml de substrat) d'une solution aqueuse de L-tyrosine supplémentée en [^{14}C] tyrosine généralement marquée (concentration finale : $2.25.10^{-3}$ M et 1 μC).

(1) en l'absence d'acide ascorbique, après 4 minutes d'incubation (2 à 5) en présence de 20 moles d'acide ascorbique par mole de substrat ; (2), après 4 minutes d'incubation (milieu incolore) ; (3) après 7 minutes d'incubation (début de la coloration jaune) ; (4) après 8 minutes d'incubation ; (5) après 10 minutes d'incubation. Chromatographie en n-butanol-acide acétique-eau (78 : 5 : 17) pendant 24 h. ; temps d'exposition : 3 jours (film Kodak Kodirex).

B. - Même expérience, mais révélation par la ninhydrine. Inhibition par KCN, après 12 minutes pour l'incubation en l'absence d'acide ascorbique (Tyr) et après 6 minutes pour celle en présence de 20 moles d'acide ascorbique par mole tyrosine (Tyr. + AH_2). T = témoin. La tache de Rf supérieur à celui de la tyrosine correspond à l'acide ascorbique résiduel (AH_2). Chromatographie en n-butanol-acide acétique-eau pendant 48 heures.

La ligne en bas des figures correspond à la zone de dépôt des mélanges analysés.

va d'ailleurs de pair, dans la première partie de l'incubation, avec l'augmentation de ceux de DOPA, X et Y.

La figure 12 montre qu'au cours de l'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase en présence d'acide ascorbique

le taux de X dans le milieu commence à augmenter de façon sensible à partir du moment où celui de la DOPA diminue. Par la suite, il décroît, en même temps qu'augmente la tache de départ.

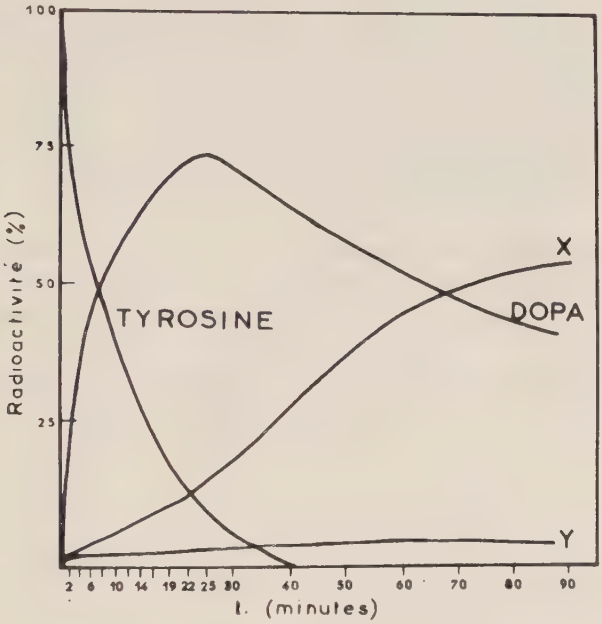


Fig. n° 12. — Cinétique de la disparition de tyrosine et de la formation de DOPA, de composé X et de pigments (Y) au cours de l'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase, en présence d'acide ascorbique.

Conditions expérimentales : le milieu d'incubation contenait : 4,7 ml d'une solution de tyrosine $2.25.10^{-3}$ M, 0.125 mg de [^{14} C] tyr, 2 ml d'une solution d'acide ascorbique à 30 mg par ml, neutralisée à pH = 6,5 par NaOH 1 N (≠ 30 moles par mole de tyrosine) et 0,030 ml de PPO-KZ dans un volume total de 12,5 ml.

Incubation à 20° C avec agitation manuelle constante.

Aux temps indiqués en abscisses, des prélèvements de 0,5 ml de l'incubat étaient effectués puis introduits dans des tubes contenant 0,05 ml d'acide acétique concentré (pour inactivation instantanée de l'enzyme).

Chromatographie sur papier Whatman n° 1 en butanol-acétique.

Durée de migration : 24 h. (dépôts de 0,050 ml de chacun des prélèvements, sur une largeur de 2 cm).

Le chromatogramme, après autoradiographie de contrôle, est découpé en bandes de 4 cm de large et l'activité des différents composés séparés est enregistrée au moyen d'un compteur à gaz pour rayonnement β modèle D 47 Nuclear (Nuclear Chicago Corp.).

Pour chaque temps on a reporté (en ordonnées) le pourcentage de l'activité de chacun des pics par rapport à l'activité totale.

Au moment du virage du milieu d'incubation à la coloration jaune la plus grande partie de l'acide ascorbique initialement contenu dans le milieu est encore présente (voir ci-dessous),

tandis que l'apparition de la coloration ultérieure orangée ou rouge correspond à la consommation de la totalité de l'acide ascorbique.

Les mêmes observations ont été faites avec la tyrosine, la glycyltyrosine, la leucyltyrosine, la glycyltyrosine-éthylester, la leucyl-tyrosine-éthylester et la thyronine.

Dans le cas de l'oxydation de la DOPA par la polyphénol-oxydase en présence d'acide ascorbique, la quantité initialement présente dans le milieu ne varie pas pendant la phase incolore. Le seul phénomène observé est la consommation de l'acide ascorbique (et évidemment d'oxygène), ce qui permet de conclure à l'existence d'un stade orthoquinonique au cours de l'oxydation de la DOPA par la polyphénoloxydase.

3° Facteurs influençant l'apparition de la coloration jaune

Cette coloration apparaît d'autant plus rapidement :

a) que la quantité d'enzyme utilisée est plus grande (fig. 13) ;

b) que l'on est plus près des conditions optimum d'action de l'enzyme en ce qui concerne le pH et la température.

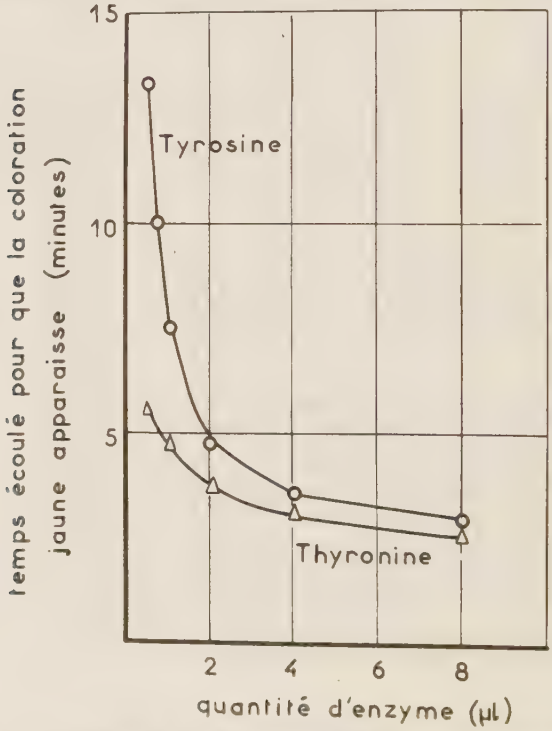


Fig. n° 13. — Influence de la quantité de polyphénoloxydase utilisée sur la vitesse d'apparition de la coloration jaune. Les milieux d'incubation contenaient 1 ml de solution aqueuse de substrat ($2.25.10^{-3}$ M) et les quantités d'enzyme indiquées en abcisses. Agitation manuelle continue à 20° C.

L'influence de quantités variables d'acide ascorbique sur la durée de la période précédant l'apparition de la couleur jaune est illustrée par la figure 14.

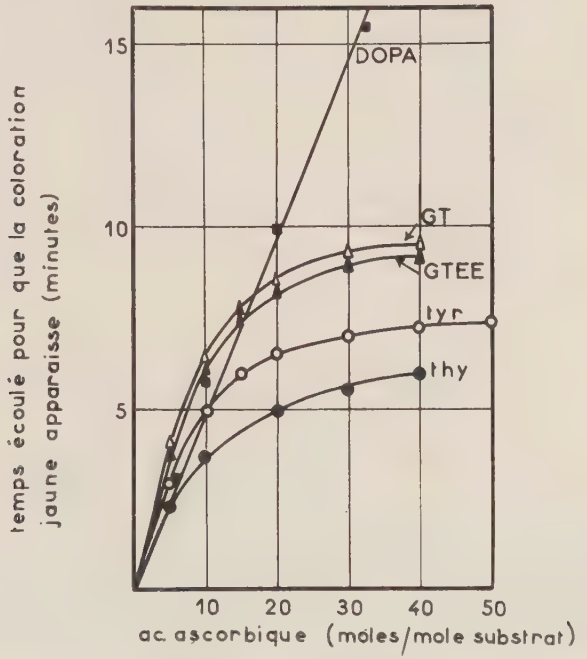


FIG. N° 14. — Influence de la quantité d'acide ascorbique utilisée sur la vitesse d'apparition de la coloration jaune. Les milieux d'incubation contenaient 1 ml de solution aqueuse de substrat ($2.25.10^{-3}$ M), 0.010 ml de polyphénoloxydase et les quantités d'acide ascorbique indiquées en abscisses. Agitation manuelle continue à 20° C.

Dans le cas des substrats monophénoliques, on voit qu'au-delà d'environ 20 moles d'acide ascorbique par mole de substrat, une augmentation de la quantité de réducteur ne retarde pas sensiblement le moment de son apparition. Cette coloration apparaît plus tardivement pour les peptides de tyrosine que pour la tyrosine et plus rapidement pour la thyronine. Sa vitesse d'apparition est donc en rapport avec l'oxydabilité des substrats par la polyphénoloxydase. Dans le cas de la DOPA, on a une droite.

4° Influence de la quantité d'acide ascorbique sur la vitesse de transformation de la tyrosine en DOPA-quinone

La figure 15 montre que l'oxydation de la tyrosine en DOPA (donc en DOPA-quinone) est d'autant plus rapide que la concentration en acide ascorbique dans le milieu est plus grande.

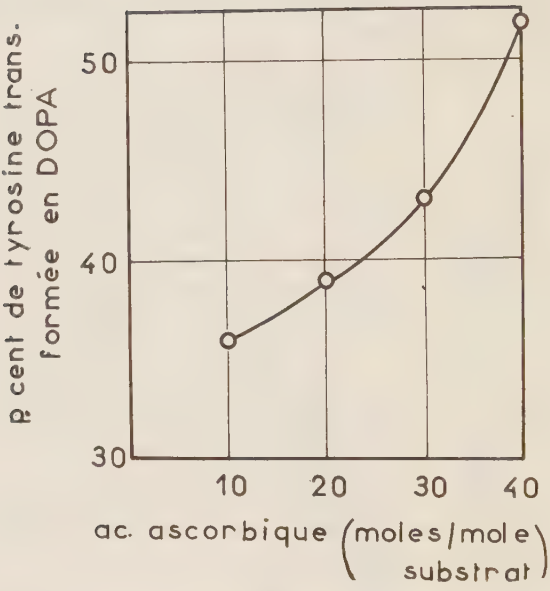


FIG. N° 15. — Influence de la quantité d'acide ascorbique utilisée sur la vitesse de transformation de la tyrosine en DOPA-quinone. Les milieux d'incubation contenaient, par ml de solution aqueuse, 2.10^{-3} M de L tyrosine, 0.004 ml de polyphénoloxydase et les quantités d'acide ascorbique indiquées en abscisses. Agitation manuelle continue pendant 5 minutes à 22° C, suivie de l'inhibition de l'enzyme. La composition des milieux d'incubation a été étudiée par chromatographie sur papier et les dosages de tyrosine (disparue) et de DOPA (apparue) réalisés selon la méthode de MORTREUIL et KHOUVINE (97).

La figure 16 illustre la cinétique de la disparition de l'acide ascorbique au cours de l'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase en présence de ce réducteur (*).

Pendant la phase initiale de l'oxydation (milieu incolore) on a une droite (1) qui s'infléchit au moment où le milieu vire au jaune pour donner une nouvelle droite (2) de pente plus faible. Cette dernière s'infléchit à nouveau quand l'acide ascorbique a presque complètement disparu, en même temps que le milieu vire à l'orangé ou au rose.

La pente de la droite (1) est d'autant plus forte (tableau VII) que : *a*) la quantité d'enzyme employée est plus grande, *b*) le substrat est plus oxydable et *c*) la quantité d'acide ascorbique est plus élevée.

(*) Les dosages de l'acide ascorbique ont été réalisés de la façon suivante : au début de l'expérience et toutes les 1,5 minutes, une partie aliquote de l'incubat est diluée (100 à 450 fois) et son absorption est lue, aussi rapidement que possible, à 265 m_μ (Beckman DU), selon EL BAYOUMI et FRIEDEN (36).

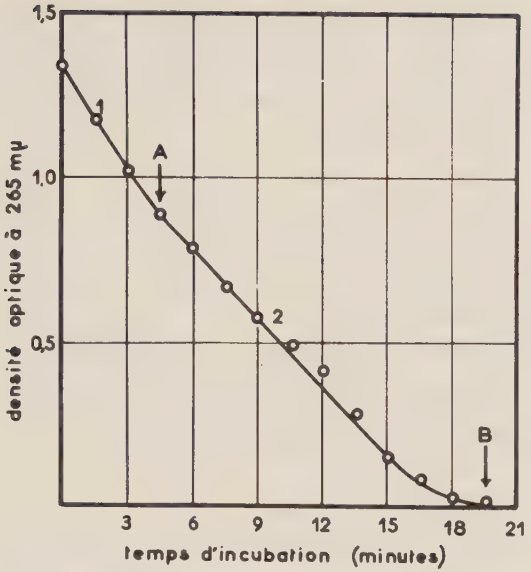


FIG. N° 16. — Cinétique de la disparition de l'acide ascorbique au cours de l'incubation d'un milieu réactionnel contenant : 1 ml de solution aqueuse de L-tyrosine ($2.25.10^{-3}$ M), 8 mg d'acide ascorbique (20 moles/mole de tyrosine), 0.020 ml de polyphénoloxydase et de l'eau pour compléter à 4 ml. Incubation à 20° C.

Aux temps indiqués en abscisses, dilution 250 fois d'une partie aliquote du milieu et mesure de la densité optique à 265 m_μ (voir texte). Le temps indiqué par la flèche A correspond au virage au jaune du milieu et celui indiqué par la flèche B à son virage au rose.

TABLEAU VII

Vitesse de disparition de l'acide ascorbique au cours de l'oxydation de différents substrats

Composition des milieux (*)			Vitesse de disparition de l'acide ascorbique (**)
Substrat	Enzyme (ml)	Moles ac. ascorbique/ mole substrat	
L-tyrosine	0,010	20	17,5
	0,020	20	26,5
L-tyrosine	0,020	20	17,0
Glycyl-tyrosine	0,020	20	15,0
Glycyl-tyrosine-éthylester .	0,020	20	14,0
	0,010	10	15,5
L-tyrosine	0,010	20	17,5
	0,010	30	19,0

(*) Ils contenaient dans un volume de 4 ml : 1 ml de substrat ($2.25.10^{-3}$ M), les quantités d'enzyme indiquées et les quantités d'acide ascorbique définies par les rapports moles acide ascorbique sur mole substrat, donnés dans le tableau. Température 20° C ; pH compris selon les groupes d'expériences, entre 6,4 et 6,8.

(**) Exprimée par la pente de la droite (A) (voir fig. n° 16) = diminution en unités optiques par minute de l'absorption du milieu à 265 m_μ (voir texte).

Ces différents facteurs sont également ceux qui agissent sur la vitesse des réactions catalysées par l'enzyme, donc sur la vitesse de formation de la DOPA-quinone dans le milieu. Ceci confirme que la vitesse de consommation de l'acide ascorbique est bien proportionnelle à la vitesse de formation de la DOPA-quinone.

D'autre part, la quantité d'acide ascorbique encore présente dans le milieu au moment de l'apparition de la coloration jaune est proportionnelle à la quantité de ce réducteur existant au début de l'incubation (tableau VIII) et à celle de la polyphénoloxydase (tableau IX).

Pour les peptides de tyrosine, on constate (tableau X) que la coloration jaune et l'inflexion de la courbe de disparition de l'acide ascorbique en fonction du temps apparaissent après une consommation d'acide ascorbique beaucoup plus élevée que dans le cas de la tyrosine.

5° Oxydation enzymatique quantitative d'un monophénol en orthodiphénol

L'expérience a montré qu'en utilisant un excès d'acide ascorbique, on pouvait agir sur la température et la quantité d'enzyme, afin d'avoir une vitesse modérée de la formation de l'orthoquinone. On se place pour cela assez loin de la température optimum (20° C) et on opère avec une quantité d'enzyme relativement faible. Si l'on étudie la transformation de la tyrosine en DOPA et de la thyronine en 3'-hydroxythyronine selon la méthode exposée en légende de la figure 15, en inhibant la réaction quelques secondes avant l'apparition de la coloration jaune, on voit que plus les quantités de polyphénoloxydase utilisées sont faibles, plus l'apparition de la coloration jaune est retardée et plus la quantité de monophénol transformé en orthodiphénol est importante avant que d'autres produits n'apparaissent dans le milieu.

Dans certaines conditions, il est possible de réaliser l'oxydation totale du substrat et sa transformation quantitative en dérivé orthodiphénolique, avant l'apparition de la coloration jaune, donc du composé X et des pigments. Il a été constaté expérimentalement que cette transformation totale est plus facile à obtenir pour la thyronine et pour les peptides de tyrosine que pour la tyrosine libre.

Les meilleurs résultats ont été obtenus dans les conditions suivantes :

a) moles d'acide ascorbique par mole de substrat : 30 à 50 pour la tyrosine ; 10 à 30 pour la thyronine et les peptides de tyrosine.

TABLEAU VIII

Influence de la quantité d'acide ascorbique utilisée sur la quantité d'acide ascorbique consommé au moment de l'apparition de la coloration jaune dans le milieu d'oxydation de la L-tyrosine

Acide ascorbique (*)		Acide ascorbique consommé au moment de la coloration du milieu		Acide ascorbique restant au moment de la coloration du milieu	
En moles par mole de substrat	En milligrammes	En pour cent d'acide ascorbique initial	En milligrammes	En pour cent d'acide ascorbique initial	En milligrammes
10	4.0	50	2.0	50	2.0
20	8.0	36	2.9	64	5.1
30	12.0	32	3.8	68	8.2

(*) Les milieux contenaient : 1 ml de solution de tyrosine $2.25.10^{-3}$ M, 0.010 ml de polyphénoloxydase et les quantités d'acide ascorbique indiquées, dans un volume complété à 4 ml avec de l'eau. Température 20° C ; pH = 6,8.

TABLEAU IX

Influence de la quantité de polyphénoloxydase utilisée sur la quantité d'acide ascorbique consommé au moment de l'apparition de la coloration jaune (oxydation de la tyrosine)

Composition des milieux (*)			Acide ascorbique consommé au moment de la coloration du milieu		Acide ascorbique restant au moment de la coloration du milieu	
Polyphénol-oxydase (ml)	Ac. ascorbique (moles/mole de substrat)	Acide ascorbique (mg)	En pour cent de l'acide ascorbique initial	En milligrammes	En pour cent de l'acide ascorbique initial	En milligrammes
0.010	10	4.0	50	2.0	50	2.0
0.020	10	4.0	32	1.3	68	2.7
0.010	20	8.0	36	2.9	64	5.1
0.020	20	8.0	26	2.1	74	5.9

(*) Voir légende du tableau VIII.

TABLEAU X

Influence de la nature du substrat sur la quantité d'acide ascorbique consommé au moment de l'apparition de la coloration jaune.

Composition des milieux (*)			Acide ascorbique consommé au moment de la coloration du milieu		Acide ascorbique restant au moment de la coloration du milieu	
Substrat	Ac. ascorbique (moles/mole de substrat)	Acide ascorbique (mg)	En pour cent de l'acide ascorbique initial	En milligrammes	En pour cent de l'acide ascorbique initial	En milligrammes
L-tyrosine	10	4.0	32	1.3	68	2.7
Glycyl-tyrosine	10	4.0	68	2.7	32	1.3
Glycyl-tyrosine-éthylester .	10	4.0	70	2.8	30	1.2

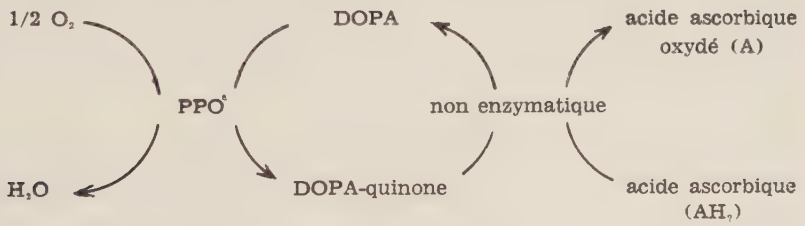
(*) Les milieux contenaient : 1 ml de solution de substrat, $2.25.10^{-3}$ M ; 0.020 ml de polyphénoloxydase et les quantités d'acide ascorbique indiquées, dans un volume de 4 ml. Température 22° C ; pH 6.8.

b) unités Hogeboom-Adams de polyphénoloxydase par ml de solution $2{,}25.10^{-3}$M de substrat : 100 à 150 pour la tyrosine ou la thyronine ; 250 à 500 pour les peptides de tyrosine.
c) température ♯ 20° C.
d) pH ♯ 6,5.

DISCUSSION

Au cours des travaux antérieurs sur le rôle des agents réducteurs dans les oxydations catalysées par la polyphénoloxydase, deux composés ont été principalement utilisés : le diphosphopyridine-nucléotide réduit (11, 30 *b*, 43) et surtout l'acide ascorbique (12, 34, 43, 107-111). Les conclusions qui ont été tirées de ces travaux sont que l'addition d'acide ascorbique au milieu d'incubation s'accompagne : *a*) d'une diminution très importante ou même d'une suppression du temps de latence précédant l'oxydation des monophénols (34, 43, 108, 109, 111) ; *b*) de l'accumulation d'orthodihydroxyphénol tant que l'acide ascorbique est présent ; *c*) d'une augmentation de la vitesse initiale de la disparition du monophénol et *d*) d'une inactivation progressive du système oxydant le monophénol, même en présence d'un excès de réducteur (107, 110). Les résultats obtenus au cours de nos expériences confirment certaines de ces propriétés.

Lors du stade incolore de l'oxydation de la tyrosine, de peptides la contenant ou de DOPA, par la polyphénoloxydase en présence d'acide ascorbique, tout se passe comme si l'orthoquinone était réduite en DOPA au fur et à mesure de sa formation selon le schéma :



Le mécanisme possible de la réaction de transformation de la tyrosine en DOPA sera discuté ultérieurement.

Ce schéma explique la présence de la seule DOPA (ou de peptides de DOPA) dans le milieu d'incubation, l'absence de pigments et l'oxydation de l'acide ascorbique. Lorsqu'apparaît la coloration jaune, il existe dans le milieu d'autres composés (X et Y) provenant de l'oxydation du substrat. Ces composés sont chromatographiquement identiques à ceux qui se forment au cours de l'oxydation en l'absence de réducteur. Ceci permet de

supposer qu'à ce stade de la réaction, après consommation d'une partie de l'acide ascorbique, et bien que le pouvoir réducteur du milieu soit encore élevé, une fraction de la DOPA-quinone formée évolue vers des formes chimiques (X) dans lesquelles le degré d'oxydation est vraisemblablement supérieur à celui de la DOPA-quinone, et vers la formation de pigments (Y). Le fait que l'action d'un réducteur ajouté en cours d'incubation à un milieu d'oxydation de tyrosine par l'enzyme se traduise par un virage de sa coloration du rouge au jaune, indique que la coloration jaune (retrouvée dans la tache Y de Rf = 0) est probablement due soit aux dérivés réduits des pigments, soit à des combinaisons entre ceux-ci et le réducteur (ou certains de ses dérivés). La coloration jaune serait ainsi le témoin de l'évolution de la réaction.

Nous avons vu au cours de l'exposé des résultats expérimentaux que les facteurs qui influent sur la vitesse d'oxydation du substrat (température, pH, quantités d'enzyme et d'acide ascorbique présentes), c'est-à-dire en définitive sur la vitesse de formation de la DOPA-quinone, sont également ceux qui gouvernent : *a*) la vitesse de consommation de l'acide ascorbique pendant la phase initiale de l'oxydation (milieu incolore) et *b*) la durée de la période précédant l'apparition de la coloration jaune. Ceci démontre que, plus grande est la vitesse de formation de la DOPA-quinone dans le milieu, plus grande est la quantité d'acide ascorbique nécessaire pour la réduire quantitativement en DOPA. Quand la DOPA-quinone se forme trop rapidement, et que l'acide ascorbique n'existe plus en quantité suffisante, une partie seulement est réduite, l'autre évoluant vers la formation de pigments. On comprend ainsi que l'apparition de la coloration jaune ne soit pas liée à la consommation d'une quantité déterminée de l'acide ascorbique (tableaux VII, VIII et IX), puisqu'elle est gouvernée par un équilibre entre la vitesse de formation de la DOPA-quinone et la quantité d'acide ascorbique encore présente dans le milieu.

L'acide ascorbique agit donc sur le système « polyphénol-oxydase-monophénols-oxygène » en réduisant l'orthoquinone formée, mais en même temps en augmentant sa vitesse de formation (fig. 15). Pour des concentrations relativement faibles (entre 5 et 20 moles d'acide ascorbique par mole de substrat), l'augmentation de la concentration en réducteur dans le milieu a pour effet de retarder l'apparition de la coloration jaune, mais au-delà, l'effet activateur sur l'oxydation du monophénol et l'effet réducteur sur la DOPA-quinone se compensent et une augmentation de la concentration en acide ascorbique ne retarde pas sensiblement l'apparition des pigments (fig. 14).

Dans le cas de l'oxydation des orthodiphénols, le temps précédant l'apparition de la coloration jaune augmente propor-

tionnellement à la quantité d'acide ascorbique ajoutée, ce qui semble indiquer que l'acide ascorbique n'a aucune influence sur la vitesse d'oxydation des orthodiphénols. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus par KRUEGER (109).

La structure du corps X n'a pas été déterminée ; il ne s'agit pas d'un composé indolique (positivité de la réaction à la ninhydrine) mais vraisemblablement d'une forme chimique dans laquelle le noyau benzénique de la tyrosine est à un degré d'oxydation plus élevé que dans la DOPA ou la DOPA-quinone. Il est stable dans le milieu d'incubation, en présence d'acide ascorbique, et sur le chromatogramme tant que celui-ci reste imprégné de solvant (butanol-acétique) ; par contre, la positivité de la réaction à la ninhydrine disparaît rapidement (15 à 20 minutes) après séchage du chromatogramme. Un tel comportement est vraisemblablement en rapport avec une cyclisation de la chaîne latérale survenant au cours d'un phénomène d'autooxydation. Il rend pratiquement impossible l'isolement de ce composé et sa mise en évidence par des moyens autres que des réactions colorées effectuées sur le chromatogramme ou l'utilisation de [^{14}C]tyrosine comme substrat (autoradiographie).

Le pouvoir réducteur (nitrate d'argent) et surtout la positivité de la réaction d'Arnow conduisent à penser que le corps X possède dans sa molécule au moins deux fonctions phénols en position ortho sur le cycle benzénique. De plus, un raisonnement basé sur la valeur de son Rf en butanol acétique permet de supposer qu'il s'agit d'un corps ayant la structure d'un dérivé trioxygéné de la phénylalanine (peut-être partiellement oxydé) : si l'on considère en effet les Rf dans le solvant n-butanol - acide acétique - eau (78 : 5 : 17) de la phénylalanine (0,41), de la tyrosine (0,22) et de la DOPA (0,10), on voit que leur valeur diminue lorsqu'une puis deux fonctions phénols sont greffées sur le noyau benzénique de la phénylalanine. Ceci traduit une augmentation de leur solubilité dans la phase aqueuse stationnaire, liée à la présence des groupements phénoliques. La fixation d'un troisième groupement hydroxyle sur le cycle pourrait expliquer la valeur du Rf du composé X (0,04). Une telle structure, si elle est confirmée, amènerait à considérer de façon différente certains stades de la mélanogénèse, le composé X étant chronologiquement le premier intermédiaire détectable formé à partir de la DOPA-quinone et précédant l'apparition des pigments.

Il est à noter qu'un corps présentant des caractères chromatographiques identiques a été mis en évidence au cours de l'oxydation de la tyrosine et de la DOPA par le système ascorbate - ions ferreux - oxygène (54). Ces observations et les caractères du composé X permettent également de le rapprocher du dérivé trioxygéné de la phényléthylamine caractérisé récem-

ment par Senoh et coll. (112) comme le métabolite de la 3 : 4-dihydroxyphényléthylamine par des coupes de cerveau.

Si le schéma donné au début de cette discussion explique bien la formation de DOPA-quinone comme intermédiaire unique dans l'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase en présence d'un excès d'acide ascorbique, il ne permet pas d'expliquer la transformation de la tyrosine en DOPA.

En relation avec les informations discutées dans l'introduction, deux hypothèses peuvent être formulées :

1) L'enzyme possède une activité hydroxylante sur les monohydroxyphénols en présence d'un excès d'acide ascorbique. Pour expliquer les résultats de l'expérience, cette activité doit non seulement ne pas être inhibée par le réducteur, mais encore être activée en sa présence. Cette hypothèse, purement gratuite dans l'état actuel de nos connaissances, pose le problème soit de l'hétérogénéité des préparations de polyphénoloxydase qui contiendraient deux enzymes (monophénolase et orthodiphénolase), soit d'un enzyme unique avec deux sites actifs, l'un pour les monophénols, l'autre pour les orthodiphénols. L'homogénéité à l'électrophorèse en veine liquide et à l'ultracentrifugation de la préparation de polyphénoloxydase utilisée dans ce travail exclut la première hypothèse. Aucun argument expérimental n'est encore venu étayer la seconde.

2) L'hydroxylation des monohydroxyphénols en orthodihydroxyphénols est liée à la présence de radicaux libres fournis par l'auto-oxydation de l'acide ascorbique.

A l'appui de cette deuxième interprétation, nous avons montré :

a) que la préincubation de la tyrosine en présence de polyphénoloxydase inactivée par la chaleur réduit la durée du temps de latence précédant l'oxydation, après addition d'enzyme actif. La formation de DOPA au cours de la préincubation a été démontrée, ainsi que l'augmentation importante de la quantité formée par addition d'acide ascorbique et d'ions cuivriques. L'enzyme ayant été préalablement inactivé, on doit penser qu'il ne s'agit pas dans ces conditions d'une influence de l'acide ascorbique ou des ions métalliques sur l'activité enzymatique de la polyphénoloxydase, se manifestant par une augmentation de son activité crésolasique, mais plus vraisemblablement d'une action de ces éléments sur un système hydroxylant auquel l'enzyme participe en apportant certains de ses constituants.

L'analogie des deux systèmes :

EDTA - Fe^{2+} - oxygène - acide ascorbique

et polyphénoloxydase inactivée - oxygène (± acide ascorbique)

tous deux actifs dans l'ortho-hydroxylation de la tyrosine, est en effet évidente, l'enzyme inactivé constituant une forme chélatée du cuivre au même titre que le chélate EDTA - Fe^{2+}.

Le premier système devant ses propriétés hydroxylantes aux radicaux libres $HO^{\bullet}$, il doit en être de même pour le second. On peut dès lors penser que dans le système polyphénol-oxydase - tyrosine - oxygène - acide ascorbique, l'auto-oxydation de l'acide ascorbique en présence de l'enzyme, jouant un rôle non spécifique de métal chélaté, est générateur des premiers radicaux libres initiant la réaction d'oxydation de la tyrosine en DOPA. Par la suite une réaction en chaîne s'établit, entretenue par les produits d'oxydation de l'acide ascorbique riches en radicaux libres tels que le radical semi-ascorbate (9, 49, 50, 113).

b) la formation du composé X dont les propriétés indiquent qu'il correspond très vraisemblablement à un dérivé tri-oxygéné de la phénylalanine. Ce composé se forme non seulement avec la tyrosine mais encore avec la DOPA comme substrat du système polyphénoloxydase + oxygène en présence ou non d'acide ascorbique.

La non-spécificité relative des mécanismes d'oxydation par les radicaux libres est bien connue (54, 58) et permet parfaitement d'expliquer la formation de dérivés trihydroxylés à partir d'orthodihydroxyphénols.

c) l'augmentation de la vitesse d'hydroxylation des monophénols par l'enzyme actif lorsqu'on ajoute au milieu des éléments constitutifs de systèmes d'hydroxylation non spécifique tels que l'acide ascorbique ou différents ions métalliques (28) milite également plus en faveur de l'interprétation évoquée ci-dessus qu'en une activation hypothétique de l'activité monophénolasique de l'enzyme, qui devrait pouvoir éventuellement s'exercer sur les orthodihydroxyphénols.

Comme X a été mis en évidence en petite quantité également dans les milieux d'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase en l'absence d'acide ascorbique, on peut dès lors se demander s'il constitue une étape normale de la mélanogénèse, comme cela a été suggéré précédemment, ou s'il ne représente qu'un intermédiaire d'une voie secondaire au cours de ces phénomènes.

Deux constatations semblent cependant venir à l'encontre de l'interprétation des propriétés hydroxylantes du système polyphénoloxydase - oxygène - acide ascorbique par des mécanismes radicalaires :

a) avec les systèmes d'hydroxylation non spécifique on obtient en général des vitesses initiales de réaction élevées,

mais qui diminuent rapidement et l'on n'aboutit jamais à l'oxydation totale des substrats monophénoliques. Les auteurs ayant étudié l'oxydation des monophénols par la polyphénoloxydase en présence d'acide ascorbique ont,, pour la plupart, effectivement observé (cf. p. 89) une inactivation progressive du système oxydant le monophénol, même lorsque le réducteur n'est pas totalement consommé ; dans ces études cependant, les quantités d'acide ascorbique utilisées sont relativement faibles (de l'ordre de une mole ou moins par mole de monophénol initialement présent). Au cours d'expériences effectuées dans ces mêmes conditions, nous avons fait des constatations analogues. L'hydroxylation totale des monophénols décrite dans ce travail paraît donc être en contradiction avec ces faits ; elle ne peut toutefois être obtenue qu'en utilisant des concentrations beaucoup plus élevées en acide ascorbique (de l'ordre de 20 à 50 moles ou plus par mole de substrat). On peut alors penser que les quantités importantes d'acide ascorbique utilisées sont responsables soit directement soit indirectement par l'intermédiaire de leurs produits de dégradation, de la formation de radicaux libres à un taux suffisant pour provoquer l'hydroxylation de la totalité du substrat. Il est à noter cependant que dans le système d'Udenfriend l'augmentation de la concentration en acide ascorbique dans le milieu ne conduit pas à une augmentation notable de la quantité de substrat hydroxylé.

b) le système polyphénoloxydase - acide ascorbique - oxygène est incapable de catalyser l'oxydation des résidus de tyrosine de la ribonucléase native (voir 2e partie, p. 107) tandis que l'action sur cette protéine du système ascorbate - ions ferreux - EDTA - oxygène se traduit par l'hydroxylation d'une quantité de tyrosine correspondant à un résidu par mole.

Cette observation ne peut recevoir actuellement d'explication satisfaisante, à moins d'admettre que le système polyphénoloxydase - acide ascorbique - oxygène est voisin des systèmes d'hydroxylation non spécifique actuellement décrits, qu'il s'en rapproche par son mécanisme (radicaux libres), mais qu'il en diffère sur certains points concernant notamment ses conditions d'action.

A la lumière des résultats de certains travaux antérieurs et des observations effectuées au cours de nos recherches, il semble que l'on puisse interpréter de la façon suivante le mécanisme d'action de la polyphénoloxydase : 1) en l'absence de réducteurs tels que l'acide ascorbique ou les phosphopyridine nucléotides, l'oxydation des orthodihydroxyphénols serait une réaction catalysée par l'enzyme et celle des monohydroxyphénols procéderait selon le mécanisme non enzymatique indirect. Dans ce dernier cas, l'initiation de la réaction serait

liée à la présence dans le milieu réactionnel de quelques molécules d'orthodihydroxyphénol ayant pris naissance soit de façon fortuite sous l'influence de facteurs physiques ou physico-chimiques divers, soit par suite de l'action d'un système d'hydroxylation non spécifique dont les différents éléments seraient les constituants mêmes de l'enzyme ; 2) la présence des réducteurs mentionnés ci-dessus ne paraît pas avoir d'influence sur la vitesse de l'oxydation des orthodihydroxyphénols par l'enzyme ; le principal phénomène observé est la réduction continuelle de l'orthoquinone formée en orthodiphénol. Il semble, par contre, que l'hydroxylation des monophénols, fortement accélérée, ne dépende plus dans ce cas de l'oxydation non enzymatique indirecte mais soit le fait de radicaux libres engendrés par un système chimique non spécifique.

Cette conception du mécanisme d'action de la polyphénol-oxydase peut être illustrée par les schémas suivants, rendant compte de l'oxydation de la tyrosine (et plus généralement des monophénols) en l'absence et en présence de réducteurs.

OXYDATION DE LA TYROSINE PAR LA POLYPHÉNOLOXYDASE EN L'ABSENCE DE REDUCTEURS

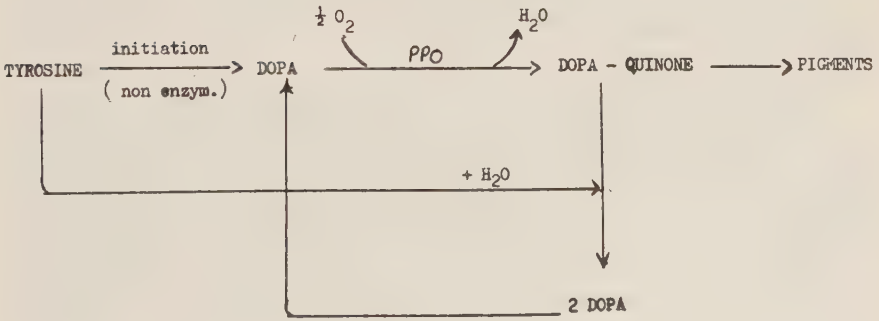
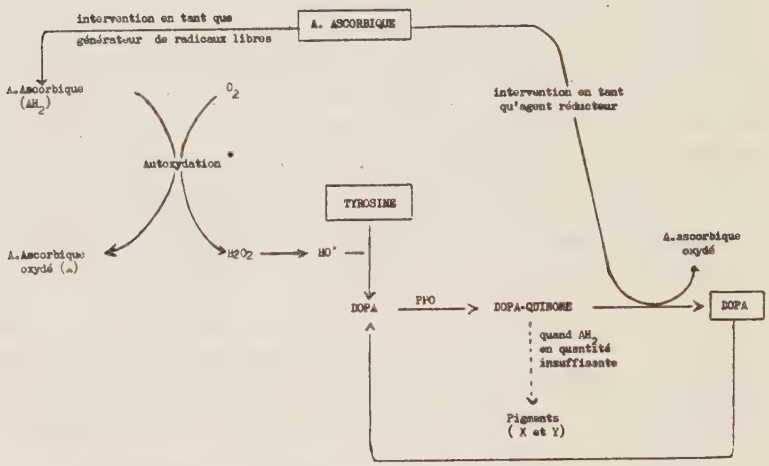


Schéma A

OXYDATION DE LA TYROSINE PAR LA POLYPHENOLOXYDASE (PPO) EN PRESENCE D'ACIDE ASCORBIQUE



* Intervention des éléments constitutifs de la polyphénoloxydase en tant qu'agents non spécifiques.

Schéma B

Une telle interprétation doit être considérée uniquement comme une hypothèse : en effet, si un certain nombre de constatations et de preuves expérimentales ont été apportées en sa faveur, aucun argument nouveau contre l'hypothèse classique de l'oxydation enzymatique directe n'a été tiré des résultats de nos recherches. Malgré les critiques justifiées dont elle a fait l'objet, cette dernière théorie ne peut être cependant éliminée d'autorité.

Les expériences décrites dans ce premier chapitre prouvent par ailleurs la stabilisation des restes de DOPA-quinone formés au cours de l'oxydation des peptides de tyrosine. Ceci fournit une explication au fait constaté expérimentalement que la transformation des restes de tyrosine en restes de DOPA dans les peptides ou dans les protéines (voir 2e partie) est plus facile à réaliser que la transformation de tyrosine libre en DOPA.

Nous avons également montré que l'oxydation de certains monophénols par la polyphénoloxydase en présence d'acide ascorbique permet d'obtenir quantitativement l'orthodiphénol correspondant. Cette méthode a été appliquée à l'obtention de [^{14}C]-DOPA en partant de [^{14}C]-tyrosine. Son utilisation peut être étendue à la préparation de composés orthodiphénoliques de synthèse difficile, dont le monophénol correspondant est substrat de l'enzyme.

DEUXIEME PARTIE

OXYDATION DES RESTES DE TYROSINE DES PROTÉINES

Différents auteurs ont, jusqu'à présent, apporté un ensemble de données expérimentales permettant de conclure que la polyphénoloxydase est susceptible de catalyser l'oxydation des restes de tyrosine de certaines protéines (32, 63-79).

Leurs observations, ainsi que les critiques formulées en ce qui concerne tant la pureté des substrats et des enzymes utilisés que les conditions d'incubation ont déjà été exposées (p. 26).

Dans cette partie du travail, nous nous sommes proposé d'étudier l'oxydation, dans différentes conditions expérimentales, de quatre protéines pures et homogènes (ribonucléase, α-lactalbumine, lysozyme et insuline) par une préparation très purifiée de polyphénoloxydase, notre but étant :

1) de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus au cours des travaux antérieurs.
2) de constater, sur le plan chimique, la réalité de la disparition de la tyrosine dans les protéines oxydées.
3) d'étudier, dans la mesure du possible, la nature des produits formés au cours de l'oxydation. Nous voulions en particulier vérifier si, comme dans le cas de l'oxydation de la tyrosine libre (cf. chapitre précédent), l'oxydation des restes de tyrosine d'une protéine conduit à la formation intermédiaire de restes de DOPA-quinone.
4) enfin, d'étudier l'influence de diverses modifications des structures secondaire et tertiaire de certaines protéines (ribonucléase et lysozyme) sur l'oxydabilité des restes de tyrosine qu'elles contiennent.

L'action de la polyphénoloxydase sur les diverses protéines étudiées a été suivie grâce aux critères suivants : *a*) modification de la coloration du milieu ; *b*) modifications de l'absorption en lumières ultraviolette et visible ; *c*) mesure de la consommation d'oxygène ; *d*) dosage de la tyrosine ; *e*) mesure de l'activité enzymatique de la ribonucléase ; *f*) dosage ou recherche de la DOPA apparue après oxydation en présence ou en l'absence d'un excès d'acide ascorbique.

RESULTATS

1° Action de la polyphénoloxydase sur certaines protéines natives

Les conditions expérimentales et les principales modifications observées sont résumées dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Action de la polyphénoloxydase sur certaines protéines natives

CONDITIONS EXPERIMENTALES (x)		PHENOMENES OBSERVES				
Protéine étudiée	Temps d'incubation (minutes)	Changement de coloration (**)	Consommation d'oxygène (moles O_2/mole de protéine)	Disparition de tyrosine (en de restes par mole de protéine)	Temps latence (***) (minutes)	Activité de la ribonucléase (+)
Ribonucléase (++)	60 à 360 ou plus	incolore	0	0	—	100
Ribonucléase (lot R574-5) .	120 à 180	r. puis J.O	1	1	2	100
Ribonucléase (++) (*)	180 à 450	incolore (+++)	0	0	—	non dosée
α lactalbumine (lot I)	120 à 360	incolore	0	0	—	—
α lactalbumine (lot I) (*) .	180 à 450	RB puis J.B	0,85 à 1,2	0,9 à 1,1	60	—
α lactalbumine (lot II)	120 à 300	r. puis R.O et J.B.	3	2,8 à 3	2	—
Lysozyme	180 à 300	incolore	0	0	—	—
Lysozyme (*)	180 à 300	incolore (+++)	0	0	—	—
Insuline	180	incolore	0	0	—	—
Insuline (*)	180	incolore (+++)	0	0	—	—

(x) Voir méthodes. Les milieux d'incubation étaient constitués de 6 à 15 mg de protéine et de 0.005 à 0.060 ml de PPO-KZ dans un volume total de 3 ml, sauf ceux des séries d'expériences marqués d'un (*), qui contenaient 1 mg de PPO-W ou PPO-L pour respectivement 8 mg de ribonucléase, 10 mg d'α-lactalbumine ou de lysozyme et 6 mg d'insuline.

(**) r : rose ; R : rouge ; J. : jaune ; O : orangé ; J.O. : jaune orangé ; J.B. : jaune brun ; R.B. : rouge brun.

(***) Laps de temps précédant la coloration du milieu et le début de la consommation d'oxygène.

(+) En pour cent de l'activité par rapport au témoin.

(++) Nombreux lots (Worthington) utilisés (voir texte).

(+++) En réalité, teinte jaune brun due à l'enzyme.

Ribonucléase. — Pour la plupart des lots de ribonucléase étudiés (lots R 16, R 536 B, R 561, R 566, R 568-9, R 570-1, R 578, R 580, R597), on n'observe, même après des temps prolongés d'incubation, en présence de PPO-KZ, de PPO-L ou de PPO-W, aucun changement de coloration du milieu, aucune consommation d'oxygène, aucun abaissement du taux de tyrosine de la molécule par rapport au témoin incubé en présence d'enzyme inactivé, pas de perte d'activité enzymatique de la ribonucléase incubée avec l'enzyme actif par rapport au témoin (*) et pas de modification du spectre d'absorption en lumière ultraviolette entre le début et la fin de l'incubation.

Toutefois, au cours d'incubations de longue durée (entre 6 et 18 heures) en tampon de faible molarité (0,01 à 0,05 M), on observe une augmentation globale de l'absorption dans l'ultraviolet, sans déplacement des longueurs d'onde caractéristiques. Cette modification semble être due à une dénaturation partielle et est, en général, accompagnée ou suivie d'une légère opalescence de la solution.

L'ensemble de ces constatations permet de conclure que ces lots de ribonucléase ne sont pas oxydés par la polyphénoloxydase. Cependant, pour une préparation de ribonucléase (lot Worthington R 574-5), l'action de la polyphénoloxydase s'est traduite, après un temps de latence de 1 ou 2 minutes, par l'apparition d'une coloration rose, puis successivement orangée et jaune, la consommation d'une mole d'oxygène et la disparition d'un reste de tyrosine par mole de protéine. Ces modifications ne s'accompagnaient d'aucune perte de l'activité enzymatique, celle-ci étant intégralement conservée par rapport au témoin incubé dans les mêmes conditions mais sans polyphénoloxydase ou avec polyphénoloxydase inactivée par la chaleur.

α-lactalbumine. — Deux lots d'α-lactalbumine ont été soumis à l'action de la polyphénoloxydase. Tous deux présentaient les mêmes caractères d'homogénéité, mais l'un (lot I) était soluble dans l'eau pure à une concentration de 2,5 p. cent, alors que l'autre (lot II) nécessitait pour sa solubilisation à 1 p. cent une concentration en NaCl de 3 p. cent (cf. chapitre « Matériel et Techniques expérimentales »).

La PPO-KZ est sans action sur l'α-lactalbumine lot I (pas de changement de coloration du milieu, pas de consommation d'oxygène, pas de disparition de tyrosine dans la molécule après incubation) alors que les PPO-W et PPO-L déterminent, après

(*) Il a été signalé (p. 50) que les solutions de ribonucléases agitées pendant 3 à 4 heures, en présence ou en l'absence de polyphénoloxydase, perdent environ 40 p. cent de leur activité enzymatique par rapport à la solution de référence.

des temps d'incubation prolongés (3 à 7 heures) et des périodes d'induction élevées (1 heure) l'oxydation d'un reste de tyrosine par mole, avec apparition d'une coloration jaune-brun de la protéine. L'α-lactalbumine lot II, par contre, est oxydable par la PPO-KZ et son oxydation se traduit, après un temps de latence de 2 minutes environ, par l'apparition d'une coloration jaune fugace virant assez rapidement au rose, puis au rouge. Ultérieurement, après 1,5 à 2 heures d'incubation, cette coloration passe progressivement à l'orangé, puis, au bout de 2 à 2,5 heures, au jaune brun.

L'étude cinétique de la consommation d'oxygène (fig. 17) montre une consommation rapide dans les premières minutes, s'amortissant ensuite en un plateau correspondant à 3 moles d'oxygène par mole d'α-lactalbumine (entre 1,5 et 3 heures). On note à ce moment la disparition de 2,8 à 3 restes de tyrosine par mole de protéine. Ultérieurement, on observe soit une reprise de la consommation d'oxygène amenant à un deuxième plateau pour lequel cette consommation correspond à 3,8-3,9 moles d'oxygène par mole d'α-lactalbumine (entre 2 et

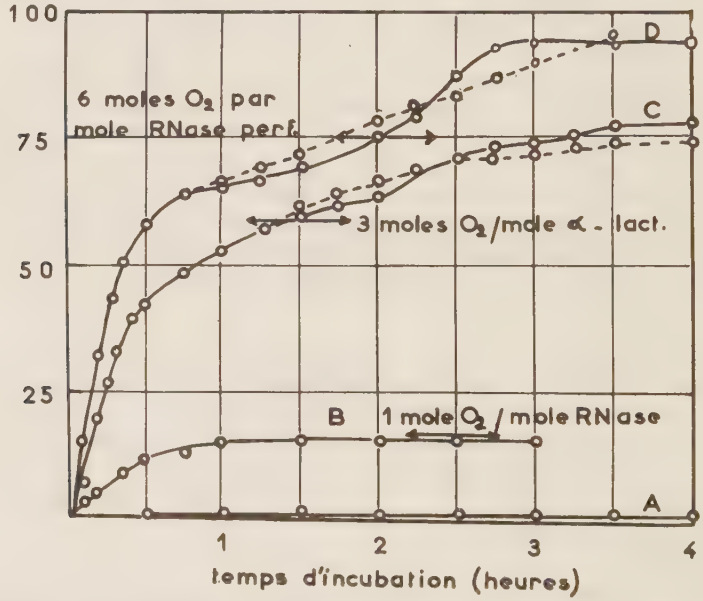


Fig. n° 17. — Cinétique de la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de diverses protéines par la PPO-KZ.

A) : ribonucléase native (différents lots).

B) : 10 mg de ribonucléase lot R 574-5.

C) : 14 mg d'α-lactalbumine (lot II).

D) : 8 mg de ribonucléase oxydée par l'acide performique.

Composition des milieux (voir tableaux XI et XII).

En ordonnées, consommation d'oxygène en microlitres.

3 heures) avec disparition de 3 à 3,3 restes de tyrosine sur les 5 que contient la protéine, soit, plus généralement une montée lente et progressive du plateau conduisant à un résultat final identique.

Il y a donc, en fin d'incubation, consommation de plus d'une mole d'oxygène par reste de tyrosine disparu. Cette observation est à rapprocher de celle de YASUNOBU et coll. (75) qui constatent la consommation de 5 moles d'oxygène par mole d'α-lactalbumine et ne notent la disparition que de 3,6 résidus de tyrosine.

Le *lysozyme* et l'*insuline* ne sont oxydés (tableau XI), même après des temps prolongés d'incubation, par aucun des enzymes utilisés.

2° Action de la polyphénoloxydase sur des protéines à structure modifiée par oxydation ou réduction des ponts disulfure, ou par dénaturation

L'oxydation de la *ribonucléase performique* par la PPO-KZ (tableau XII et fig. 17) s'accompagne, après un temps de latence de l'ordre de 1 minute (entre 45 secondes et 1,5 minute) de l'apparition d'une coloration jaune fugace, puis rose-rouge, virant ultérieurement à l'orangé et enfin au jaune-brun.

La consommation d'oxygène, rapide au départ, se stabilise à peu près, entre 1 et 2 heures à 6 moles d'oxygène par mole de protéine, pour environ 6 restes de tyrosine disparus. Comme dans le cas de l'α-lactalbumine lot II, une nouvelle consommation se produit ultérieurement, pouvant être, selon les expériences, relativement brutale ou plus généralement étalée dans le temps, et se stabilise aux environs de 7,4 à 7,7 moles d'oxygène par mole de protéine. Dans le même temps, la coloration du milieu vire du rouge à l'orangé puis au jaune-brun.

La recherche de DOPA après hydrolyse, en fin d'incubation, est négative, même lorsque le milieu d'incubation a été préalablement réduit par l'acide ascorbique. Il en était de même avec l'α-lactalbumine lot II.

Les PPO-L et PPO-W après des temps d'incubation de l'ordre de 7 à 9 heures et des temps de latence prolongés (30 à 45 minutes) n'aboutissent, pour les quantités utilisées (tableau XII) qu'à la consommation de 3 moles d'oxygène et à la disparition de 3 résidus de tyrosine par mole de protéine.

La ribonucléase dénaturée par traitement avec les acides forts dilués (HCl 5.10^{-3}N) ou par l'urée 8M pendant 16 à 20 heures à 37° C puis dialysée contre de l'eau jusqu'à élimination complète des réactifs (dénaturation réversible) n'est pas oxydée par l'enzyme (pas de changement de coloration du milieu, pas de consommation d'oxygène, pas de modification du

TABLEAU XII

Action de la polyphénoloxydase sur certaines protéines à structure modifiée

CONDITIONS EXPERIMENTALES (*)			PHENOMENES OBSERVES			
Protéine étudiée	Quantité de protéine (mg)	Temps d'incubation (minutes)	Changement de coloration (**)	Consommation d'O_2 (moles O_2/mole de protéine)	Disparition de tyrosine (en restes par mole de protéine)	Temps de latence (***) (minutes)
Ribonucléase performique ..	6 à 10	180 à 360	J. fugace, r R. et J.B.	6 puis 7.3 à 7.7	6	1
Ribonucléase performique (*)	6	300 à 570	R.B. puis J.B.	2.8 à 3.2	2.9 à 3.2	30 à 45
Ribonucléase dénaturée à pH = 13	8	180	Incolore	0	0	—
Ribonucléase traitée par l'urée 8M à pH = 10.6 ...	3	120	r., O puis J.O	♯ 6	4 à 5	0,5 à 1
Lysozyme réduit ou dénaturé	1,5 à 2	120	r., O puis J.O	observée	non dosée	0.5 à 1

(*) Les milieux d'incubation contenaient, suivant la quantité de protéine utilisée, de 0.020 à 0.060 ml de PPO-KZ dans un volume final de 3 ml, sauf ceux de la série d'expériences marqués d'un astérisque (*), qui contenaient 0,7 mg de PPO-L.

(**), (***) Voir légendes du tableau XI.

spectre d'absorption dans l'ultraviolet, pas de disparition de tyrosine). Un résultat identique est obtenu lorsqu'on traite dans des conditions similaires l'α-lactalbumine lot I et le lysozyme.

La ribonucléase ne devient pas non plus oxydable après avoir été maintenue pendant 17 heures à pH = 13 (NaOH) et à 37° C, dans des conditions où se produit une dénaturation partielle irréversible de la protéine, caractérisée par (114-116) une ionisation normale des 6 groupements phénoliques des restes de tyrosine, des modifications spectrales et la perte de l'activité enzymatique. Par contre, si l'on effectue une dénaturation irréversible de la ribonucléase par l'urée 8M à pH = 10,6 (voir p. 51 et réf. 86) on observe une oxydation par la PPO-KZ, se traduisant par une consommation d'oxygène voisine de 6 moles par mole de protéine et la disparition de 4 ou 5 restes de tyrosine (tableau XII). L'utilisation de solutions protéiques très diluées, due à la faible solubilité de la ribonucléase ainsi dénaturée, n'a pas permis d'effectuer de façon plus précise les déterminations de consommation d'oxygène et de disparition de tyrosine.

Le lysozyme réduit (87) *ou dénaturé* dans les conditions décrites ci-dessus (86) est également oxydé (coloration rose, puis orangée et jaune du milieu d'incubation). Là encore, la faible solubilité de ces produits à pH = 6,8 n'a pas permis de réaliser des déterminations quantitatives précises ; cependant on a pu observer une consommation d'oxygène en rapport avec la quantité minime de protéine dissoute.

3° Action de la polyphénoloxydase en présence de catéchol

Les conditions expérimentales et les données obtenues concernant cette étude sont résumées dans le tableau XIII.

En présence de faibles quantités de catéchol (0,05 à 0,5 mole par mole de protéine), la ribonucléase n'est pas oxydée, que l'on opère en l'absence ou en présence de 5 à 30 moles d'acide ascorbique par reste de tyrosine contenu dans le substrat.

Avec 3 moles de catéchol par mole de ribonucléase, on n'observe également aucune oxydation (pas de consommation d'oxygène par rapport au témoin catéchol + polyphénoloxydase, et surtout, pas de disparition de tyrosine). On observe par contre une perte de 88 p. cent de l'activité enzymatique. Par addition d'acide ascorbique après l'incubation (4 moles par mole de catéchol initialement présente dans le milieu), on peut retrouver 30 p. cent de l'activité disparue, en même temps que le milieu passe du rouge-brun au jaune. Ces observations sont à rapprocher de celles effectuées par Kertesz au cours d'expériences similaires utilisant le lysozyme comme substrat (72).

TABLEAU XIII

Action de la polyphénoloxydase sur diverses protéines en présence de catéchol ou d'acide ascorbique

CONDITIONS EXPERIMENTALES (*)				PHENOMENES OBSERVES				
Protéine étudiée	Temps d'incubation (minutes)	Substances ajoutées au milieu d'incubation		Consommation d'oxygène (moles par mole de protéine)	Disparition de tyrosine (restes par mole de protéine)	DOPA apparue (restes par mole de protéine)	Temps de latence (minutes)	Activité de la ribonucléase (**)
		Catéchol (en moles par mole de protéine)	Ac. ascorbique (en moles par reste de tyrosine de la protéine)					
Ribonucléase	30 à 360	0.05 à 0.5 ou (et)	5 à 30	0	0	0	—	non dosée
Ribonucléase	210	3	—	0	0	0	—	12 (***)
Ribonucléase - Lot R 574-5	14	—	40	—	1	identifiée	1	100
Ribonucléase performique	450	12	—	6	6	0	—	—
Ribonucléase performique	20 à 30	—	20 à 40	—	6	6	0.5 à 1	—
α-lactalbumine I	180 à 300	0.1 à 0.5	—	0	0	0	—	—
α-lactalbumine I	180	1.5	—	1.4	1.4	0	—	—
α-lactalbumine I	240	12.5	—	2.6	2.7	0	—	—
α-lactalbumine II ...	40	—	20 à 40	—	2.9	3	1	—
Lysozyme	150	—	20 à 40	0	0	0	—	—

(*) Les milieux d'incubation étaient constitués de 5 à 12 mg de protéine et de 0.010 à 0.060 ml de PPO-KZ dans un volume de 3 ml.

(**) En pour cent de l'activité par rapport au témoin.

(***) Voir texte.

La ribonucléase performique, en présence de catéchol (12 moles par mole de ribonucléase) et de PPO-KZ consomme 6 moles d'oxygène (par rapport au témoin catéchol + polyphénoloxydase) en même temps que les 6 restes de tyrosine disparaissent.

L'α-lactalbumine lot II, en présence de PPO-KZ et de catéchol (10 moles par mole de protéine) consomme environ 3 moles d'oxygène (toujours en tenant compte du témoin catéchol + polyphénoloxydase) et l'on observe, en fin d'incubation, la disparition de 3 résidus de tyrosine par mole de protéine.

L'α-lactalbumine lot I, qui n'est pas oxydée directement par la PPO-KZ, consomme d'autant plus d'oxygène que la quantité de catéchol ajoutée au milieu (entre 0,1 et 12 moles par mole de protéine) est plus importante. On note en même temps qu'une quantité équivalente de restes de tyrosine disparaît (tableau XIII).

Enfin, en se basant sur les mêmes critères que dans le cas de la ribonucléase (pas de consommation d'oxygène par rapport au témoin catéchol + polyphénoloxydase et pas de disparition de tyrosine), on voit que le lysozyme, en présence de 7 moles de catéchol par mole de protéine, n'est pas non plus oxydé par la PPO-KZ.

Dans tous les cas, la recherche de DOPA après hydrolyse des protéines oxydées a été négative, le milieu ayant été ou non réduit par l'acide ascorbique en fin d'incubation, après inactivation de l'enzyme.

Si l'addition de catéchol n'a pas d'influence sur l'oxydabilité de certaines protéines par la polyphénoloxydase (ribonucléase, lysozyme), il convient de remarquer, par contre, que lorsque l'on envisage l'oxydation du catéchol par l'enzyme, l'addition de ces protéines non oxydables augmente la vitesse initiale de la consommation d'oxygène, sans pour autant modifier la valeur finale de cette consommation (1,2 à 1,3 mole d'oxygène par mole de catéchol). Le mécanisme de cette activation est vraisemblablement dû à l'élimination de l'orthoquinone du milieu au fur et à mesure de sa formation, du fait de sa condensation à certaines fonctions de la protéine. Parmi ces fonctions, les groupements $—NH_2$ paraissent jouer un rôle prédominant (27 et voir 3e partie).

4° Action de la polyphénoloxydase en présence d'acide ascorbique

Il a été montré, dans la première partie de ce travail, que l'action de la polyphénoloxydase sur les monophénols en présence d'un excès d'acide ascorbique, conduit à l'obtention quantitative du dérivé orthodiphénolique correspondant, par réduction de l'orthoquinone au fur et à mesure de sa formation.

Il était donc important de vérifier si, dans le cas des protéines oxydables ou de leurs dérivés, l'oxydation des restes de tyrosine suivait une voie identique à celle parcourue par la tyrosine libre, c'est-à-dire : tyrosine - - - - - → DOPA-quinone.

Ceci pouvait être démontré par la mise en évidence de la DOPA dans les protéines oxydées par l'enzyme en présence d'acide ascorbique, l'action réductrice de ce composé sur les résidus de DOPA-quinone étant ici encore envisagée indépendamment de sa participation éventuelle aux mécanismes d'hydroxylation de la tyrosine, discutée dans l'introduction et la première partie de ce travail.

Les conditions d'ordre général concernant cette expérimentation ont été exposées dans le premier chapitre, les conditions particulières des incubations et les résultats obtenus ont été donnés dans le tableau XIII.

La cinétique de l'oxydation de la ribonucléase performique par la PPO-KZ en présence d'acide ascorbique, lorsqu'on étudie la consommation d'oxygène (fig. 18) permet de mettre en évidence, après un temps de latence de 30 secondes à 1 minute, trois phases successives : la première, durant les 10 premières

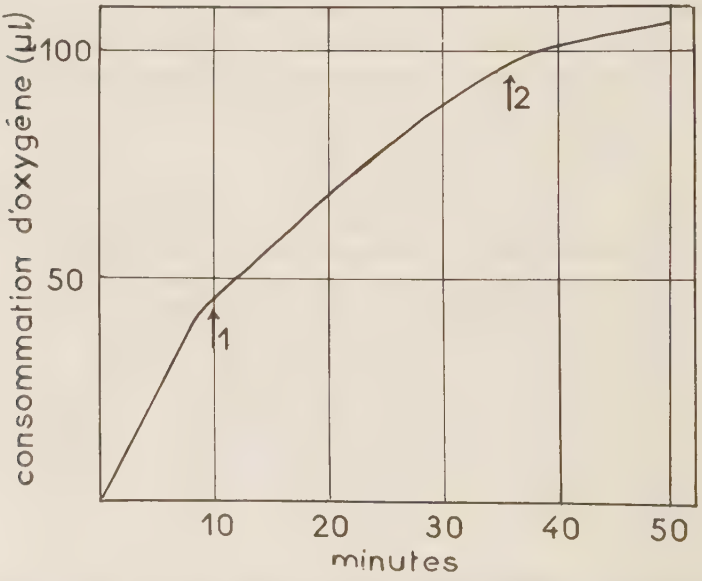


Fig. n° 18. — Cinétique de la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de la ribonucléase performique par la PPO-KZ, en présence d'acide ascorbique. Conditions expérimentales décrites dans le texte et dans le tableau XIII.

(1) Temps à partir duquel la tyrosine du substrat a été complètement oxydée.

(2) Début d'apparition de la coloration jaune.

minutes, traduit l'oxydation des restes de tyrosine en restes de DOPA-quinone et la réduction de ceux-ci en DOPA par l'acide ascorbique ; la seconde, qui va de pair avec la disparition complète des restes de tyrosine dans la protéine, correspond au « turn over » de la réaction DOPA-quinone ------→ DOPA, cette dernière étant réoxydée d'une manière continuelle par l'enzyme ; enfin, la troisième, qui s'accompagne de l'apparition d'une coloration jaune, semble être le témoin d'une déviation de la réaction par suite d'une insuffisance d'acide ascorbique dans le milieu.

Au terme de telles incubations, l'inactivation de l'enzyme est obtenue par un chauffage de 30 à 45 secondes à 70° C, après addition de quelques milligrammes d'acide ascorbique, destinés à augmenter le pouvoir réducteur du milieu.

Le dosage de la tyrosine après 20 minutes d'incubation (inactivation de l'enzyme, dialyse, hydrolyse chlorhydrique, fractionnement sur colonne de Dowex 50 et dosage spectrophotométrique), montre que 5,8 à 6 restes de tyrosine sur les 6 que contient la molécule ont disparu.

Le dosage de la DOPA, par la réaction d'Arnow, et par spectrophotométrie après fractionnement permet la mise en évidence (après hydrolyse par H.COOH 5N en présence de Dowex) de 3,4 à 3,7 restes ce qui, compte tenu des pertes inhérentes à l'hydrolyse, indique une transformation totale des 6 restes de tyrosine en restes de DOPA. Après hydrolyse par HCl 6N, 4 à 4,4 restes de DOPA sont dosés.

D'autres arguments qui seront développés ultérieurement (étude des propriétés des DOPA protéines, 3e partie) plaident également en faveur de l'oxydation des restes de tyrosine en restes de DOPA au sein des protéines oxydées par la polyphénol-oxydase en présence d'acide ascorbique.

L'étude de l'oxydation de la ribonucléase native (lot R 574-5) en présence d'acide ascorbique montre la transformation du reste de tyrosine oxydable en reste de DOPA. La mesure de l'activité enzymatique permet de constater que celle-ci est intégralement conservée pour la protéine oxydée. Par contre, les autres lots de ribonucléase native étudiés ne subissent aucune modification lorsqu'ils sont soumis à l'action de la polyphénol-oxydase en présence de quantités variables d'acide ascorbique (tableau XIII).

Pour l'α-lactalbumine lot II, on constate (tableau XIII) la disparition de 3 restes de tyrosine sur les 5 que contient la molécule et l'on peut mettre en évidence leur transformation en restes de DOPA (dosage de 1,9 reste de DOPA après hydrolyse par H . COOH 5N en présence de Dowex, et de 1,5 reste après hydrolyse par HCl 6N). En outre l'étude de la cinétique

de la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de cette protéine, conduit à des constatations analogues à celles effectuées dans le cas de l'oxydation de la ribonucléase performique.

5° Modifications du spectre d'absorption des protéines en lumière ultraviolette au cours de l'oxydation par la polyphénoloxydase

La figure 19 montre l'évolution du spectre de la ribonucléase native après 3 et 14 heures d'incubation en présence de PPO-KZ.

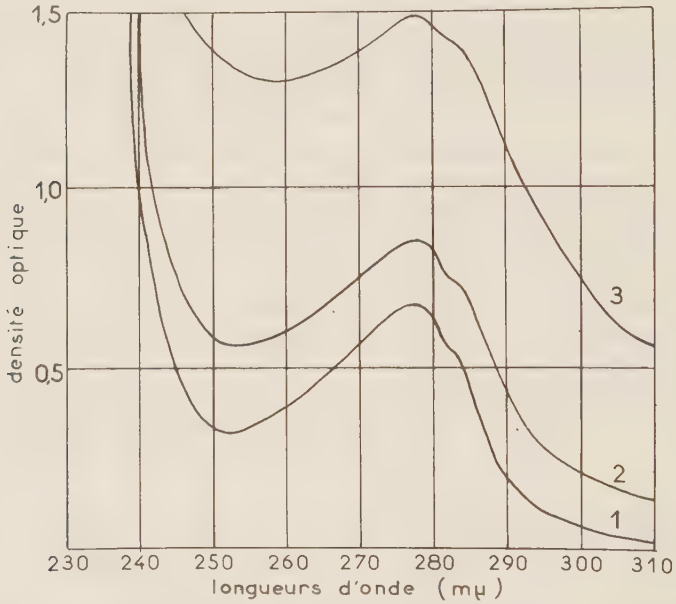


FIG. N° 19. — Evolution du spectre d'absorption dans l'ultraviolet de la ribonucléase native au cours d'une incubation en présence de PPO-KZ. Le milieu d'incubation contenait 15 mg de ribonucléase dans un volume de 3 ml de tampon phosphate 0.033 M, de pH = 6.8 et 0.040 ml de PPO-KZ.

Agitation dans l'appareil de Warburg à 37° C et 120 rotations par minute.

Spectres enregistrés avec le spectrophotomètre Beckman DK_2 dans des cuves en silice de 1 cm, en diluant 5 fois le milieu d'incubation. Les résidus de tyrosine de la protéine n'étaient pas oxydés en fin d'incubation (voir texte p. 99) :

(1) spectre réalisé au début de l'expérience ;

(2) après 3 heures d'incubation ;

(3) après 14 heures d'incubation.

On notera l'augmentation globale de l'absorption, sans modification des valeurs des longueurs d'onde caractéristiques. Il a déjà été signalé qu'au cours de cette incubation, il n'y a ni coloration du milieu (légère opalescence après quelques heures d'agitation), ni consommation d'oxygène, ni disparition de tyrosine dans la protéine. Des constatations analogues ont été

effectuées au cours de l'incubation de l'α-lactalbumine lot I et du lysozyme.

Le spectre d'absorption de la ribonucléase performique soumise à l'action de la PPO-KZ (fig. 20) montre initialement une augmentation progressive du maximum d'absorption à 275 mμ ainsi que de l'épaulement à 280 mμ avant qu'aucun changement de coloration ne se manifeste. Ce phénomène s'accentue assez rapidement puis l'apparition d'une coloration rose coïncide avec le développement d'une inflexion dont la longueur d'onde maximum se situe vers 310-312 mμ. Avec la coloration rouge, la valeur du rapport λ max. 275 mμ : λ min. 250 mμ diminue en même temps que la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption se déplace progressivement de 275 à 280 mμ et que l'inflexion à 310-312 mμ devient plus importante.

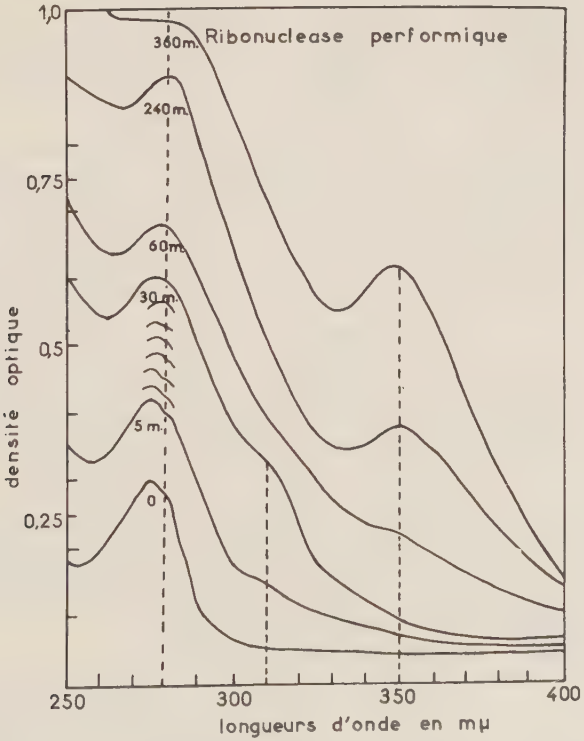


FIG. N° 20. — Modifications du spectre d'absorption en lumière ultraviolette de la ribonucléase performique au cours de son oxydation par la PPO-KZ. Le milieu d'incubation contenait 1,5 mg de ribonucléase performique dissous dans 3 ml d'eau et 0.005 ml de PPO-KZ.

Incubation réalisée dans une cuve en silice de 1 cm du spectrophotomètre Beckman DK_2 avec barbotage continu d'oxygène ; température 20° C.

Ce stade est suivi ultérieurement d'un virage du milieu à l'orangé puis au jaune-brun : il y a alors un maximum d'absorption unique à 280 mμ, l'inflexion à 310-312 mμ s'est estompée puis a disparu et l'on voit apparaître une bande très marquée dont le maximum se situe à 350 mμ.

Quand on oxyde (fig. 21) une quantité plus grande de protéine en présence d'une quantité subòptimale d'enzyme, on prolonge la durée de la phase jaune initiale signalée précédemment et difficile à observer dans les conditions normales d'incubation du fait de sa fugacité. On note alors l'apparition, puis le développement d'une bande d'absorption dont le sommet est situé vers 390 mμ. Quand le milieu vire au rose, cette dernière s'efface pour faire place à la bande de λ max. = 310-312 mμ.

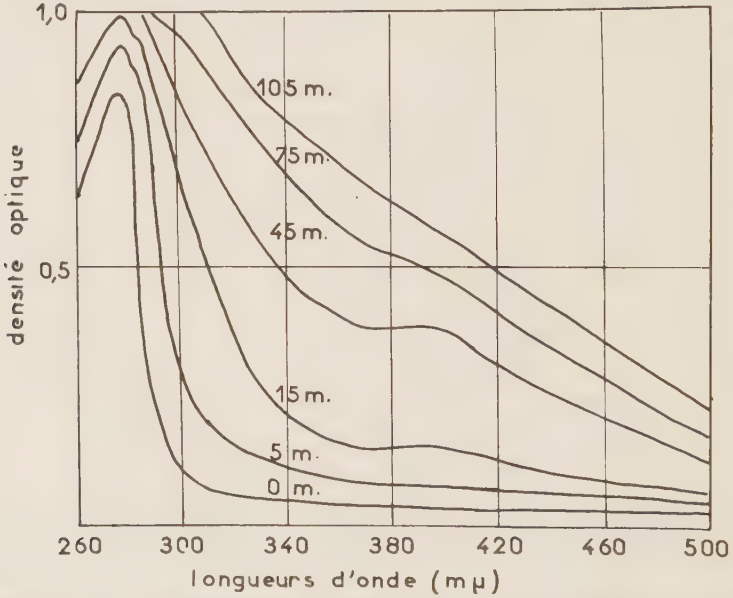


Fig. n° 21. — Modifications du spectre d'absorption en lumière ultraviolette de la ribonucléase performique au cours de son oxydation par la PPO-KZ. Le milieu d'incubation contenait 3 mg de protéine dissous dans 3 ml d'eau et 0.002 ml de PPO-KZ. Conditions d'incubation identiques à celles décrites en légende de la fig. 20.

A 15 minutes : apparition de la coloration jaune.

A 75 minutes : apparition de la coloration rose.

Le spectre de la ribonucléase oxydable (lot R 574-5) présente une évolution analogue : augmentation globale de l'absorption dans tout l'ultraviolet, diminution de la valeur du rapport absorption λ max. : absorption λ min. et apparition de la bande de λ max. = 350 mμ. Cette bande présente toutefois une intensité relative (par rapport à la bande d'absorption principale) plus faible que dans le cas de la ribonucléase performique.

En outre, le sommet de la bande d'absorption principale (277,5 mμ) ne subit pas de déplacement : on note une simple accentuation de l'épaulement à 279 mμ, mais il n'y a pas comme dans le cas précédent un « glissement du maximum d'absorption » à 280 mμ.

Enfin, l'étude des modifications du spectre d'absorption dans l'ultraviolet de l'α-lactalbumine lot II a permis de faire des constatations identiques à celles décrites par YASUNOBU et coll. (32, 75, 76) et de retrouver en particulier la bande de λ max. = 350 mμ.

DISCUSSION

Indépendamment de l'aspect biologique sous lequel elle peut être considérée (participation de protéines oxydées à la mélanogénèse) l'étude de l'oxydation de certaines protéines par la polyphénoloxydase tire son intérêt du fait que l'on connaît très peu d'enzymes susceptibles de catalyser des transformations chimiques portant sur les groupements réactifs des protéines et que l'on ignore habituellement les conditions structurales nécessaires à cette action.

Les expériences décrites au cours de ce chapitre, dont les résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par différents auteurs (tableau XIV) apportent la preuve chimique que le résidu d'acide aminé oxydé est bien la tyrosine : en effet, durant la première phase de l'incubation, il y a disparition d'un résidu de tyrosine associé à la consommation d'une mole d'oxygène.

De plus, ces expériences démontrent que la tyrosine est oxydée en DOPA-quinone, ainsi qu'en témoigne la présence de DOPA dans les molécules protéiques après oxydation en présence d'un excès d'acide ascorbique. La DOPA a été caractérisée de façon indiscutable et dosée, après hydrolyse des protéines, selon les méthodes et avec les critères précédemment décrits (chapitre « Matériel et Techniques expérimentales »). Cette caractérisation permet d'interpréter la bande d'absorption dans l'ultraviolet de λ max. = 390 mμ comme correspondant aux restes de DOPA-quinone apparus dans la molécule au cours de l'oxydation. La mise en évidence de cette bande d'absorption confirme que le blocage de la fonction aminée de la tyrosine dans une liaison peptidique détermine une stabilisation de la forme quinonique, liée vraisemblablement à une impossibilité de cyclisation de la chaîne latérale. Une telle stabilisation a déjà été signalée par YASUNOBU et coll. (32) dans le cas de l'oxydation de peptides contenant de la tyrosine en position C terminale.

La bande d'absorption de λ max. = 350 mμ, caractéristique des protéines oxydées par la polyphénoloxydase, et déjà décrite par ce même auteur (32, 75) dans le cas de l'α-lactalbumine, de

TABLEAU XIV

Protéine étudiée	Poids moléculaire	Nombre de résidus de tyrosine	O_2 consommé par mole de protéine		
			YASUNOBU et coll.	FRIEDEN et coll.	Ce travail
Ribonucléase	14.000	6	1.1	0.33	0 ou 1
α-lactalbumine	16.000	5	4.7	5	0 ou 3
Ribonucléase performique	14.000	6	—	6	6
Insuline	6.000	4	—	4	0
Lysozyme	15.000	3	0	0	0

l'hypertensine I et de l'ACTH a été retrouvée, au cours de notre étude pour l'α-lactalbumine, la ribonucléase native (lot R 574-5) et la ribonucléase performique. Cette bande apparaît à la phase terminale de l'oxydation, lorsque le milieu passe du rouge orangé au jaune-brun et semble être le reflet de la « période d'état » de la protéine oxydée. Son importance relative, par rapport aux autres bandes d'absorption dans l'ultraviolet des protéines oxydées est, en fin d'incubation, d'autant plus grande qu'un nombre plus important de résidus de tyrosine par molécule de protéine est impliqué dans l'oxydation.

Le caractère de non oxydabilité des restes de tyrosine de certaines protéines (ribonucléase, lysozyme, α-lactalbumine lot I, insuline) peut être dû à la fois à un facteur stérique (la configuration dans l'espace d'une protéine globulaire pouvant être telle que certains restes de tyrosine se trouvent inclus, masqués au sein de la molécule et ne sont pas accessibles de la surface) et au blocage des fonctions phénols de la tyrosine par des liaisons hydrogène.

Dans le cas de la ribonucléase, des observations effectuées à partir d'études spectrophotométriques en lumière ultraviolette (114, 117, 118) et titrimétriques (114, 115) (constatation de l'ionisation à un pH anormalement élevé de trois groupements phénoliques appartenant à des résidus de tyrosine alors que les trois autres s'ionisent normalement) ont conduit à penser que, sur les six groupements phénoliques que contient la molécule, trois sont libres et trois participent à des liaisons hydrogène (117-119). Le fait qu'aucun résidu de tyrosine ne soit oxydable par la polyphénoloxydase met l'accent, du moins en ce qui concerne les trois groupements phénoliques libres, sur le rôle joué par le facteur stérique.

La destruction totale des structures secondaire et tertiaire de la ribonucléase (cas de la ribonucléase performique) rend accessibles à l'oxydation les six restes de tyrosine de la molécule, les influences à la fois du facteur stérique et des liaisons hydrogène étant éliminées dans ce cas.

La dénaturation par l'urée 8 M à pH = 10,6, qui détruit de façon irréversible la structure tertiaire (86) conduit, en dehors d'une perte importante de la solubilité dans l'eau, à l'oxydabilité par la polyphénoloxydase d'un certain nombre de résidus de tyrosine, masqués dans la protéine native (ribonucléase, lysozyme). Une dénaturation de ce type conduit à la fois à la libération des groupements phénoliques impliqués dans des liaisons hydrogène (ionisation normale des six groupements phénoliques de la ribonucléase) et à la suppression partielle du facteur stérique. On sait en effet que, dans le cas de la ribonucléase, les liaisons hydrogène jouent un rôle important dans

le maintien de la rigidité et de la configuration spatiale de la molécule (117, 120, 121) et que leur rupture provoque un déplissement partiel de la chaîne. La structure de la protéine devient alors beaucoup plus lâche puisque seuls les 4 ponts disulfure subsistent pour déterminer la configuration spatiale de la molécule. Une telle désorganisation de la structure de la protéine ainsi dénaturée doit être responsable de l'accessibilité de la plupart des restes de tyrosine à l'oxydation par la polyphénoloxydase.

La dénaturation en milieu alcalin (pH = 13), qui s'accompagne d'une rupture irréversible des liaisons hydrogène intéressant les groupements phénoliques des résidus de tyrosine (constatée par spectrophotométrie dans l'ultraviolet et titrimétrie) mais non d'un déplissement total de la chaîne, maintient le facteur stérique, mais supprime l'influence des liaisons hydrogène. Le caractère non oxydable de la ribonucléase ainsi dénaturée permet de penser que, dans le cas de cette protéine, le facteur stérique joue un rôle prédominant.

Lorsque la dénaturation est réversible (HCl dilué ou urée 8M à pH neutre) aucun résidu de tyrosine ne devient accessible à l'oxydation. On doit donc admettre que la molécule de ribonucléase, qui a subi un déplissement en présence d'urée 8M, se retrouve, après élimination de ce réactif, sous sa forme initiale : les liaisons hydrogène se reforment vraisemblablement entre les mêmes points de la chaîne, maintenant ainsi le facteur stérique qui interdit l'oxydation par la polyphénoloxydase des trois restes de tyrosine dont les groupements phénoliques sont libres.

Des expériences ayant pour but de réaliser l'oxydation de la ribonucléase et du lysozyme en solution dans l'urée 8M, dans des conditions où le facteur stérique est partiellement supprimé et où les six groupements phénoliques de la ribonucléase s'ionisent normalement (119), ont également été négatives. Il a été constaté à cette occasion que les différentes préparations de polyphénoloxydase utilisées sont capables d'oxyder la tyrosine, la DOPA et le catéchol en solution dans l'urée 8M, mais par contre sont sans effet dans ces conditions sur des substrats protéiques oxydables comme la ribonucléase performique ou l'α-lactalbumine lot II, même lorsqu'elles sont utilisées en grand excès. Ces constatations semblent infirmer les conclusions de Yasunobu et coll. (76) qui, de la non oxydabilité du lysozyme en solution dans l'urée 8M avaient déduit que le facteur empêchant l'oxydation des restes de tyrosine de la molécule devait être recherché dans la structure primaire de la protéine.

Parmi tous les lots de ribonucléase étudiés, un seul (R 574-5) s'est avéré oxydable par la polyphénoloxydase. Ce lot (100 mg)

ayant été en notre possession avant l'utilisation de la technique de chromato-électrophorèse, il ne nous a pas été possible de déterminer si l'oxydation du 1/6 de la quantité de tyrosine contenue dans la protéine correspondait à l'oxydation d'un résidu de tyrosine par molécule de ribonucléase ou à celle de la totalité des résidus dans une molécule sur six.

A la lumière des faits qui viennent d'être exposés, on peut cependant penser que si tous les résidus de tyrosine d'une partie des molécules avaient été oxydables, ce caractère aurait été lié à une différence profonde de structure. L'homogénéité dont a fait preuve ce lot vis-à-vis de différents tests semble plaider plutôt en faveur de la première des possibilités évoquées. Son oxydabilité est probablement liée à une faible différence structurale, rendant accessible à l'enzyme un résidu de tyrosine. La position de ce résidu dans la molécule n'a pas été déterminée, mais il n'est vraisemblablement pas inclus dans le site actif, puisqu'une modification de la structure tertiaire à son niveau, son oxydation ou sa transformation en reste de DOPA ne modifient pas les propriétés enzymatiques de la ribonucléase.

La différence d'oxydabilité des deux lots d'α-lactalbumine étudiés, en fonction de l'origine de l'enzyme utilisé, provient vraisemblablement des propriétés dénaturantes des PPO-L et PPO-W. En effet, la PPO-KZ, bien qu'ayant une activité spécifique 40 à 70 fois plus forte, ne catalyse pas l'oxydation du lot I. Le temps de latence important (1 heure) observé avec les préparations commerciales peut être interprété comme une période pendant laquelle les impuretés de nature phénolique contenues dans ces enzymes (ou leurs produits d'oxydation) provoquent une dénaturation partielle de la protéine et rendent un reste de tyrosine accessible à leur action (tableau XI). L'apparition d'un et de deux restes de tyrosine oxydables lorsque l'oxydation par la PPO-KZ est opérée en présence de quantités croissantes de catéchol (tableau XIII) plaide en faveur de cette interprétation et met l'accent sur les propriétés dénaturantes du (ou des) produits d'oxydation du catéchol dans ce système.

L'oxydabilité directe du lot II d'α-lactalbumine doit alors être interprétée en fonction d'un certain degré de dénaturation de la protéine, ayant pris naissance au cours de sa préparation ou durant sa conservation (dans $[NH_4]_2SO_4$ à demi-saturation).

L'oxydabilité par la polyphénoloxydase constitue donc un test très sensible et très spécifique du caractère accessible des résidus de tyrosine d'une protéine. En dehors du facteur stérique évident, le blocage des fonctions phénols par des liaisons hydrogène peut exclure la possibilité d'oxydation par l'enzyme. Il est ainsi possible d'envisager l'application de cette propriété à l'étude du degré de liberté des groupements phéno-

liques en fonction de l'activité, notamment au niveau des sites actifs des enzymes, auxquels participe la tyrosine.

Enfin, les résultats décrits pour la ribonucléase et l'α-lactalbumine permettent de constater que certaines protéines pures et homogènes vis-à-vis d'un grand nombre de critères (y compris l'activité biologique) peuvent cependant présenter des différences dans leur structure tertiaire, différences que l'on peut mettre en évidence par le caractère oxydable ou non d'un ou de plusieurs résidus de tyrosine.

TROISIEME PARTIE

PROPRIÉTÉS DES PROTÉINES OXYDÉES ET DE CERTAINES DOPA-PROTÉINES

Au cours de la deuxième partie de ce travail, il a été confirmé que la polyphénoloxydase de champignon est capable de catalyser l'oxydation des restes de tyrosine de certaines protéines. Nous avons montré également que les premiers stades de cette oxydation consistent en la transformation de tout ou partie des restes de tyrosine des protéines en restes de DOPA-quinone. Toutefois, étant donné la réactivité de la fonction orthoquinonique, ces restes, une fois formés, sont susceptibles de réagir ultérieurement, ainsi qu'en témoignent : 1) l'impossibilité de mettre en évidence la DOPA, en fin d'incubation, après réduction de la protéine oxydée par l'acide ascorbique et 2) la consommation d'oxygène qui correspond toujours, en fin d'incubation, à plus d'une mole par reste de tyrosine disparu.

On peut penser que ces restes de DOPA-quinone, s'ils sont dans l'impossibilité de se cycliser du fait du blocage de leur fonction aminée dans une liaison peptidique, peuvent cependant se condenser avec d'autres restes d'acides aminés possédant un groupement réactif libre et appartenant soit à la même chaîne (condensation interne), soit à une chaîne différente (polymérisation). La constatation, décrite dans ce chapitre, d'une élévation importante du poids moléculaire de la ribonucléase performique soumise à l'action de la polyphénoloxydase démontre ce type de polymérisation mais n'exclut pas cependant la possibilité de condensation interne.

Par ailleurs, nous avons déjà montré que l'oxydation de certaines protéines en présence d'un excès d'acide ascorbique conduit à la formation de DOPA-protéines dans lesquelles tout ou partie des restes de tyrosine ont été remplacés par des restes de DOPA. Certaines des propriétés chimiques de ces protéines modifiées vont être également exposées.

RESULTATS

1° Propriétés de certaines DOPA-protéines

Les données concernant la préparation des DOPA-protéines ont été exposées au cours des deux précédentes parties de ce travail.

Dans le cas de la *DOPA-ribonucléase performique*, les arguments en faveur de la transformation totale des restes de tyrosine en restes de DOPA sont déduits :

a) de l'extension à une longue chaîne polypeptidique des résultats obtenus avec la tyrosine, la thyronine et certains dipeptides de tyrosine ;

b) de la constatation après hydrolyse de la disparition des 6 restes de tyrosine de la molécule et du dosage d'une quantité de DOPA qui, compte tenu des pertes en cours d'hydrolyse, correspond à 6 restes ;

c) du spectre d'absorption dans l'ultraviolet de la DOPA-protéine (fig. 22).

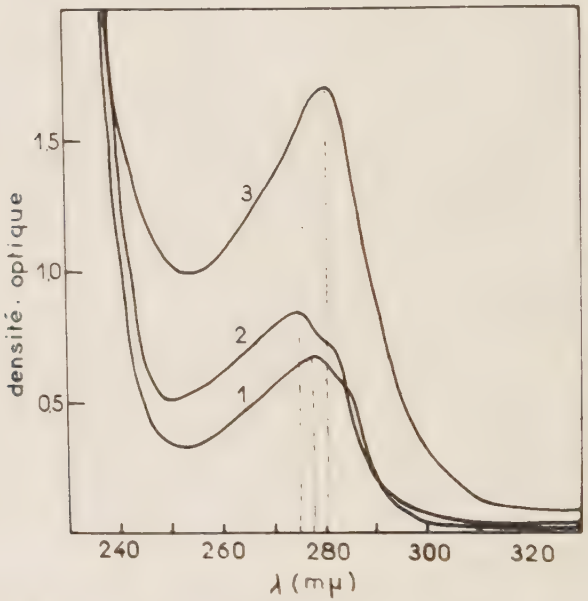


Fig. n° 22. — Spectres d'absorption dans l'ultraviolet (spectrophotomètre Beckman DU, cuves en silice de 1 cm) de solutions aqueuses à la concentration de 0,1 pour cent de :

1) ribonucléase native (λ max. = 277,5 m_μ) ;

2) ribonucléase performique (λ max. = 275 m_μ) ;

3) DOPA-ribonucléase performique (λ max. = 280 m_μ).

Ce spectre montre un déplacement du maximum d'absorption qui passe de 275 mμ pour la ribonucléase performique à 280 mμ pour la DOPA-ribonucléase performique. Il montre également une augmentation du coefficient d'absorption $E^{1\%}_{1\,cm}$ qui passe de 8,45 à 275 mμ pour la ribonucléase performique à 17,06 à 280 mμ pour la DOPA-ribonucléase performique, soit un

rapport E DOPA - ribonucléase performique : E ribonucléase performique égal à 2,02. Ces modifications peuvent être comparées à celles observées pour la tyrosine et la DOPA (λ max. respectifs 274,5 et 279 mμ ; E DOPA : E tyrosine ≠ 2,3).

La DOPA-ribonucléase performique est soluble dans l'eau à des concentrations de 2 à 3 mg par ml. Elle réduit le $AgNO_3$ ammoniacal et donne, en solution et sur papier, une réaction d'Arnow positive. Elle est auto-oxydable : ses solutions, abandonnées à la température du laboratoire et à la lumière, virent au brun-rouge en quelques jours en même temps que l'on observe une disparition progressive de la DOPA.

Elle se présente comme un produit homogène à l'électrophorèse sur papier : la figure 23 montre, à pH = 8,6 et en contre-courant, sa migration comparée à celle de la ribonucléase

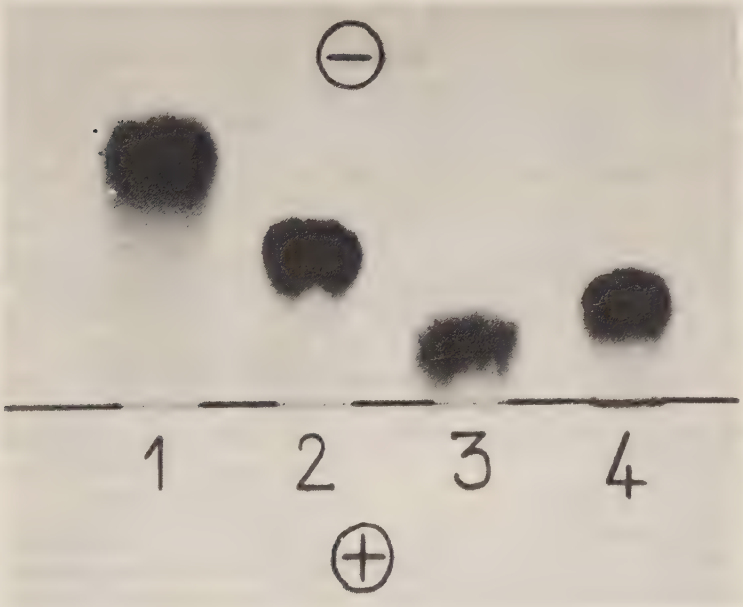


Fig. n° 23. — Migrations électrophorétiques comparées de :

1) ribonucléase native,

2) ribonucléase performique,

3) ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ,

4) DOPA - ribonucléase performique.

Conditions expérimentales : électrophorèse à contre-courant en cuve horizontale (voir texte) à pH 8,6 ; papier Whatman n° 3 MM ; 120 volts pour 21 cm ; intensité = 6 milliampères pour une largeur de 20 cm ; durée de migration : 15 heures.

native, de la ribonucléase performique et de la ribonucléase performique oxydée par la polyphénoloxydase en l'absence d'acide ascorbique.

La DOPA-ribonucléase performique se comporte comme une protéine de pH isoélectrique (pHi) plus bas que la ribonucléase performique, cet abaissement du pHi étant lié au remplacement des six groupements phénoliques des restes de tyrosine par les six groupements orthodiphénoliques des restes de DOPA, présentant un caractère acide plus marqué. Dans les conditions expérimentales d'électrophorèse utilisées, l'électronégativité des différentes protéines croît dans l'ordre suivant : ribonucléase native, ribonucléase performique, DOPA-ribonucléase performique et ribonucléase performique oxydée par la polyphénoloxydase. Dans le cas de cette dernière, la migration électrophorétique plus faible peut s'expliquer, en plus d'un abaissement plus grand du pHi, par une taille plus importante de la molécule liée à sa polymérisation (voir paragraphe suivant).

La ribonucléase performique et la DOPA-ribonucléase performique se colorent moins intensément avec le bleu de bromophénol et le noir amide que la ribonucléase native ; la ribonucléase performique oxydée ne prend que très faiblement ces deux colorants, alors qu'elle est bien révélée par la nigrosine.

Enfin, une autre propriété intéressante qu'a permis de mettre en évidence la DOPA-ribonucléase performique a été étudiée précédemment (p. 65) : il s'agit de la stabilisation de la DOPA vis-à-vis de l'hydrolyse par HCl 6N, lorsqu'elle est incluse dans une chaîne peptidique.

La DOPA-α-lactalbumine présente des propriétés analogues, ainsi que la *DOPA-ribonucléase native* (lot R 574-5) dans laquelle un reste de tyrosine est transformé en reste de DOPA. Il a déjà été signalé (p. 107) que, dans ce cas, l'activité enzymatique de la ribonucléase est intégralement conservée.

Les observations précédentes doivent être rapprochées des modifications constatées après action sur la ribonucléase du système d'hydroxylation acide ascorbique - ions ferreux - oxygène. Le spectre après oxydation (fig. 24) indique une accentuation relative de l'épaulement à 280 mμ associée à la transformation de deux restes de tyrosine en restes de DOPA dans le cas de la ribonucléase performique et d'un reste dans le cas de la ribonucléase native.

Pour cette dernière, l'oxydation d'un reste de tyrosine par molécule s'accompagne, en outre, de la perte de 70 p. cent de l'activité enzymatique par rapport au témoin, incubé dans des conditions analogues.

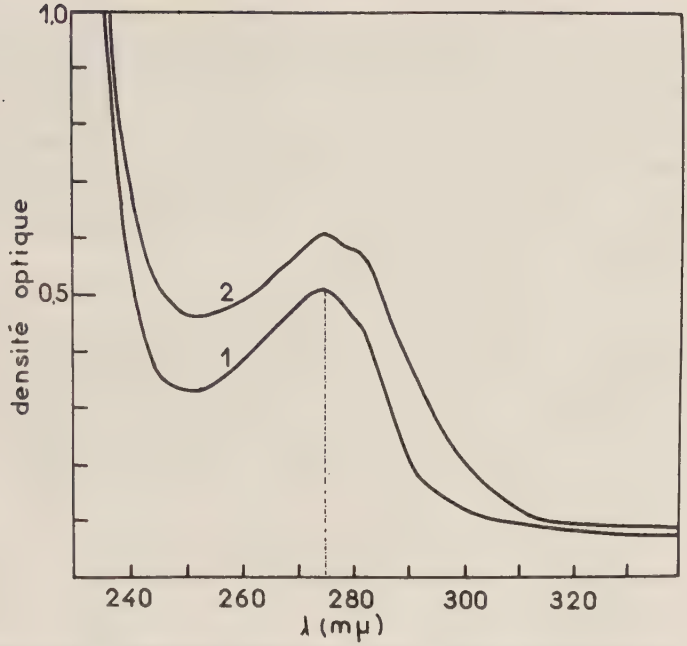


FIG. N° 24. — Spectres d'absorption dans l'ultraviolet de solutions :
1) de ribonucléase performique ;
2) de ribonucléase performique après action du système ascorbate ions ferreux-oxygène.

Conditions expérimentales : le milieu d'incubation contenait dans un volume final de 2 ml : protéine, 7 mg ; acide ascorbique, 3 mg ; $FeSO_4$: 0,82 mg ; EDTA : 1 mg.

L'oxydation a été poursuivie pendant 90 min. dans un thermostat à 37° C sous barbotage d'oxygène. Le témoin contenait les mêmes éléments, sauf $FeSO_4$ et son incubation a été réalisée sans barbotage d'oxygène.

2° Propriétés de la ribonucléase performique après oxydation par la polyphénoloxydase

Lorsqu'on étudie la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de la ribonucléase performique par la PPO-KZ (chapitre précédent, p. 101 et fig. 17) on voit qu'au moment où est atteint le plateau, cette consommation est voisine de 6 moles d'oxygène par mole de ribonucléase performique. On constate également à ce stade la disparition à peu près totale des six restes de tyrosine que contient la molécule.

Pendant cette première phase de l'oxydation, il est possible de mettre en évidence (après inactivation de l'enzyme et réduction par l'acide ascorbique, suivie d'une dialyse prolongée) une certaine quantité de DOPA, soit directement sur la solution de protéine, soit après hydrolyse.

Durant la deuxième phase de l'oxydation, la consommation supplémentaire d'oxygène signalée précédemment s'accom-

pagne : *a*) d'un changement de coloration du milieu d'incubation qui, de rouge foncé, vire progressivement au jaune-brun ; *b*) d'une diminution de la solubilité de la protéine oxydée, se manifestant quelquefois par une précipitation partielle au sein du milieu d'incubation ; *c*) de l'apparition d'une fluorescence jaune-verdâtre en lumière ultraviolette ; *d*) de l'impossibilité de mettre en évidence la DOPA après réduction par l'acide ascorbique et *e*) de l'apparition de la bande d'absorption dans l'ultraviolet de λ max. = 350 mμ.

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet (fig. 25) enregistré à différents pH montre que cette bande de λ max. = 350 mμ, qui paraît caractéristique des protéines oxydées, existe en milieu neutre et acide mais disparaît en milieu alcalin. Sa disparition en milieu alcalin va de pair avec des modifications de la bande d'absorption principale de λ max. = 280 mμ qui augmente en intensité et se décale vers les grandes longueurs d'onde pour atteindre la valeur de 292 mμ.

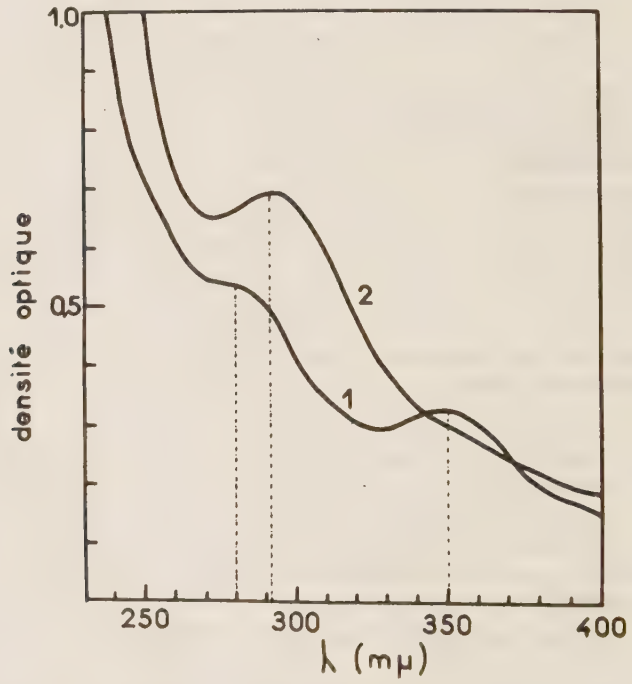


Fig. n° 25. — Spectres d'absorption dans l'ultraviolet de solutions de ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ.

1) dans l'eau, dans HCl 0,1 N ou dans l'urée 8 M (spectres identiques : λ max. 280 et 350 m_μ) ;

2) dans NaOH 0,1 N (λ max. 292 m_μ).

Ce dernier fait semble indiquer la persistance dans la molécule de groupements ionisables de type phénolique ou quinonique.

Les « fingerprints » obtenus par chromatographie-électrophorèse à partir d'un mélange de peptides provenant de la digestion par la trypsine et la chymotrypsine de la ribonucléase performique oxydée sont notablement différents de ceux obtenus dans les mêmes conditions à partir de ribonucléase performique n'ayant pas subi l'action de la polyphénoloxydase (fig. 26).

L'explication de cette différence peut être trouvée à la fois dans la disparition d'une partie des sites d'action spécifiques de la chymotrypsine (oxydation des résidus de tyrosine) et dans un remaniement structural important de la molécule après oxydation. Ces deux facteurs réunis justifieraient (indépendamment de la disparition des peptides contenant de la tyrosine, dont la cause est évidente) : *a*) du nombre relativement faible de peptides trouvés après digestion de la protéine oxydée et *b*) de la tache pigmentée ne migrant pas en chromatographie et s'étalant vers la cathode en électrophorèse. Cette tache doit être rattachée à une fraction de la molécule non attaquée par les enzymes protéolytiques.

3° Polymérisation de la ribonucléase performique après oxydation par la polyphénoloxydase

Ces observations conduisent à penser qu'au cours de l'oxydation des protéines par la polyphénoloxydase, si l'oxydation des restes de tyrosine aboutit à la formation initiale de restes de DOPA-quinone (*), ceux-ci, bien que partiellement stabilisés par les liaisons peptidiques, subissent néanmoins une évolution ultérieure dont la conséquence est un remaniement structural de la molécule protéique. Etant donné leur réactivité, on peut penser que ces restes, dans l'impossibilité où ils sont de se cycliser, peuvent se condenser avec des acides aminés possédant des fonctions chimiques libres et appartenant soit à la même chaîne polypeptidique, soit à d'autres chaînes. Cette condensation conduirait dans le premier cas à un réarrangement structural de la molécule et dans le second à une polymérisation.

Les données apportées par l'étude du poids moléculaire et de la constante de sédimentation de la ribonucléase performique oxydée par la polyphénoloxydase, si elles n'infirment pas la première hypothèse, amènent une confirmation de la seconde.

(*) ... pouvant être caractérisés au début de l'incubation : *a*) par l'apparition d'une bande d'absorption transitoire de λ max. = 390 $m\mu$, et *b*) par la mise en évidence de DOPA après réduction de la DOPA-quinone par l'acide ascorbique.

A

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau XV.

Ils montrent que divers lots de ribonucléase native non oxydable étudiés ont une constante de sédimentation identique avant et après action de la polyphénoloxydase, égale à 1,9 S. Ces valeurs trouvées pour la constante de sédimentation de la ribonucléase native sont en bon accord avec celles déterminées par SCHACHMAN : 1,98 S (122) et par ROTHEN : 1,85 S (123). On voit également que la constante de sédimentation du lot 574-5 de ribonucléase n'est pas modifiée après qu'un reste de tyrosine de la molécule ait été oxydé par la PPO-KZ.

La constante de sédimentation de la ribonucléase performique, égale à 1,0 S passe, après oxydation par la PPO-KZ à 2,0 S.

La détermination des poids moléculaires des protéines étudiées (voir « Techniques expérimentales », p. 70, et

B

FIG. N° 26. — Photographie d'une séparation par chromatographie-électrophorèse des peptides obtenus par digestion trypsique puis chymotrypsique de : (A) ribonucléase performique ; (B) ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ. Les taches entourées d'un trait plein (A) sont révélées par l'α-nitroso-β-naphtol et correspondent aux peptides de tyrosine.

Dans le cliché B, on a reporté en traits interrompus la position occupée par ces peptides dans le cliché A.

La révélation à l'α-nitroso-β-naphtol donne, dans le cas de la protéine oxydée, une tache très allongée colorée en rose-brun (entourée dans B par un trait continu) se superposant à la tache colorée en brun avant révélation.

Conditions expérimentales (voir chapitre : « Techniques expérimentales », page 67).

tableau VI) a permis de constater que cette augmentation de la constante de sédimentation est en relation avec un accroissement du poids moléculaire de la protéine soumise à l'action de l'enzyme. Le poids moléculaire de la ribonucléase native a été trouvé égal à 13.700, valeur qui coïncide raisonnablement avec celles trouvées dans la littérature (SCHACHMAN [122] par

TABLEAU XV

Protéine étudiée	Conditions expérimentales	Volume spécifique partiel (ml/g)	Constante de sédimentation (unit. Svedberg)	Poids moléculaire
Ribonucléase native	divers lots	0,701	1,9	13.700
	lot R 574-5		1,9	
	divers lots incubés avec PPO-KZ		1,9	
	lot R 574-5 oxydé par PPO-KZ		1,9	
Ribonucléase performique	diverses préparations en solution dans l'urée 8M	0,6	1,0 0,5 - 0,6	13.000
Ribonucléase performique oxydée par la polyphénol-oxydase	après 2 heures d'incubation	0,6	1,5	66.000
	après 4 heures d'incubation		2,0	
	après réduction par acide ascorbique		2,0	
	en solution dans urée 8M		1,2	
Mélange à parties égales de ribonucléase performique et de ribonucléase performique oxydée par PPO-KZ			1,3	

équilibre de sédimentation : 13.650, ROTHEN [123] par équilibre de sédimentation : 13.000 ; à partir des constantes de sédimentation et de diffusion : 12.700). Le poids moléculaire de la ribonucléase performique est égal à 13.000, valeur très proche de celle de la ribonucléase native, et celui de la ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ à 66.000. La valeur trouvée dans ce dernier cas implique une polymérisation dont le degré moyen se situe à 5 environ.

Le volume spécifique partiel des différentes protéines a été déterminé par picnométrie. Dans le cas de la ribonucléase native, la valeur trouvée, et utilisée dans les calculs, est de 0,701 ml par gramme, valeur très proche de celle donnée par ROTHEN (123), égale à 0,709 ml par gramme. Par contre, la faible solubilité de la ribonucléase performique oxydée n'a pas permis d'effectuer les mesures avec des solutions concentrées. Dans l'état actuel des recherches, il est seulement possible de dire que les volumes spécifiques partiels de la ribonucléase performique et de la ribonucléase performique oxydée sont identiques et de l'ordre de 0,6 ml par gramme.

Le mélange en quantités égales de ribonucléase performique et de ribonucléase performique oxydée (constantes de sédimentation respectivement égales à 1,0 S et 2,0 S) donne un seul pic à l'ultracentrifugation ; la constante de sédimentation trouvée dans ce cas est intermédiaire entre les deux valeurs et égale à 1,3 S. Un tel comportement résulte du manque de résolution, pendant le temps de leur migration, entre les deux pics correspondant à deux constituants indépendants et très voisins. Il ne doit être interprété comme le résultat ni d'une interaction entre les deux protéines contenues dans le mélange, ni d'une égalité de la valeur des constantes de sédimentation des deux constituants. YASUNOBU et DANDLIKER (75), au cours de l'étude de l'oxydation de l'α-lactalbumine, avaient déduit à partir de données semblables à celles qui viennent d'être exposées, que cette protéine, soumise à l'action de la polyphénoloxydase ne subissait aucune polymérisation. Les faibles quantités d'α-lactalbumine dont nous disposions ne nous ont pas permis de réaliser la détermination du poids moléculaire de cette protéine après oxydation et, par là, de confirmer ou d'infirmer de façon certaine les conclusions de ces auteurs. Si toutefois, on admet qu'aucune variation du poids moléculaire ne se produit au cours de l'oxydation de l'α-lactalbumine par la polyphénoloxydase, on est amené à penser que la polymérisation est conditionnée par un certain degré de liberté de la chaîne protéique, existant dans le cas de la ribonucléase performique, mais non dans celui d'une protéine native comme l'α-lactalbumine. Cependant, la consommation d'oxygène supérieure en fin d'incubation à une mole par reste de tyrosine disparu et surtout la similitude des spectres

d'absorption dans l'ultraviolet obtenus au cours de l'oxydation de l'α-lactalbumine et de la ribonucléase performique incitent à penser que l'évolution des restes de DOPA-quinone formés a lieu dans les deux cas selon un mécanisme voisin, sinon identique. Il se pourrait que, dans le cas de l'α-lactalbumine, la condensation des résidus de DOPA-quinone se produise uniquement avec des restes d'acides aminés présents dans la même molécule.

4° Mécanisme chimique de l'évolution des restes de DOPA-quinone dans les protéines oxydées

Le traitement par l'acide ascorbique de la ribonucléase performique oxydée, bien que se traduisant par un affaiblissement discret de la coloration du milieu, ne donne lieu à aucun changement de la constante de sédimentation (tableau XV). Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet de la protéine traitée dans les mêmes conditions n'est pas non plus modifié.

L'action de l'urée 8M ou de HCl dilué n'entraîne également aucune modification spectrale. En outre, dans l'urée 8M, la constante de sédimentation de la ribonucléase performique oxydée demeure sensiblement le double (1,2 S) de celle de la ribonucléase performique (0,5 à 0,6 S), la diminution de la valeur des constantes étant due à l'augmentation de la densité et de la viscosité du milieu solvant.

Ces faits indiquent que les liaisons qui se créent par suite de la réaction des restes de DOPA-quinone avec des restes d'autres acides aminés (et qui sont responsables de la polymérisation de la protéine oxydée) sont des liaisons covalentes.

Les résultats de l'analyse de la composition en acides aminés de la ribonucléase performique d'une part et de la ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ d'autre part, sont reportés dans le tableau XVI. Ils montrent une différence de composition pour la lysine et l'alanine, dont une partie a disparu dans la protéine oxydée, et pour l'ammoniac dont le taux se trouve considérablement augmenté.

Or, la lysine est un acide aminé stable vis-à-vis de l'hydrolyse chlorhydrique et les valeurs cohérentes obtenues dans les séries d'expériences (10,0 ; 10,2 ; 10,1 dans le cas de la ribonucléase performique — 8,5 ; 7,3 ; 7,1 ; 7,5 ; 7,7 dans le cas de la ribonucléase performique oxydée) confirment qu'il ne s'agit pas d'un artéfact, mais plutôt du « masquage » d'une partie des restes de lysine. Dans la protéine oxydée, on peut penser que ces restes se seraient condensés avec les restes de DOPA-quinone avec formation de liaisons covalentes, liaisons n'ayant pas été rompues ou l'ayant été seulement de façon partielle au cours de l'hydrolyse de la protéine.

TABLEAU XVI

Composition comparée en acides aminés (nombre de résidus par molécule) de la ribonucléase performique et de la ribonucléase performique oxydée par la polyphénoloxydase

	Ribonucléase native (*)	Ribonucléase performique	Ribonucléase performique oxydée par PPO-KZ (**)
Acide cystéique		non dosé	non dosé
Méthionine sulfone		3,8 (3,7 - 4)	4 (3,9 - 4,1)
Acide aspartique	15	15,2 (14,7 - 15,5)	15,1 (14,6 - 15,8)
Thréonine (***)	10	8,75 (7,9 - 9)	9,1 (8,7 - 9,7)
Sérine (***)	15	11,2 (9,9 - 11,8)	11,2 (10,1 - 13,3)
Acide glutamique	12	12,0 (12,0 - 12,1)	12,0 (12,0 - 12,2)
Proline	4	3,8 (3,65 - 4)	4,1 (3,7 - 4,3)
Glycocolle	3	3 (3,0 - 3,1)	3,1 (3,0 - 3,3)
Alanine	12	12,5 (12,0 - 13,0)	11 (10,5 - 12,2)
Cystine (½)	8		
Valine	9	9,2 (9,1 - 9,5)	9,1 (9,0 - 9,4)
Méthionine	4		
Isoleucine	3	2,6 (2,6 - 2,7)	2,6 (2,5 - 2,9)
Leucine	2	2,1 (2,0 - 2,1)	2,2 (2,0 - 2,4)
Tyrosine	6	5,85 (5,8 - 6)	traces
Phénylalanine	3	2,85 (2,7 - 3)	3 (2,9 - 3,2)
NH_3	17	18 (16,5 - 20)	23,7 (21,0 - 24,8)
Lysine	10	10,1 (10,0 - 10,2)	7,6 (7,1 - 8,5)
Histidine	4	3,9 (3,7 - 4,2)	3,7 (3,5 - 3,8)
Arginine	4	4 (4,0 - 4,1)	4 (3,8 - 4,2)

Les valeurs données sont la moyenne de 3 et de 5 déterminations pour respectivement la ribonucléase performique et la ribonucléase performique oxydée par la polyphénoloxydase (les chiffres entre parenthèses représentent les valeurs extrêmes obtenues au cours de ces déterminations).

(*) Indiquée à titre de référence.

(**) Composition ramenée à la molécule monomère de ribonucléase.

(***) La disparition d'un résidu de thréonine et de quatre résidus de sérine tient à la destruction partielle de ces acides aminés par suite de l'hydrolyse de 24 heures à 110° C.

Les nombres soulignés correspondent aux acides aminés dont le taux a varié après oxydation par la polyphénoloxydase.

En outre, l'examen des graphiques d'enregistrement obtenus avec l' « Auto-Analyzer » a montré que le pic correspondant à l'ammoniac était dissymétrique et paraissait constitué en fait de deux pics superposés. Etant donné la valeur trop forte trouvée pour l'ammoniac, on pouvait penser qu'un autre composé, libéré au cours de l'hydrolyse de la protéine oxydée, était élué au même niveau. Ce composé aurait pu être constitué d'une molécule de lysine unie à une molécule de DOPA-quinone par l'intermédiaire de son groupement ε—NH_2. La confirmation de cette hypothèse a été apportée par l'analyse de la partie de l'effluent de la colonne de chromatographie correspondant à l'élution de l'ammoniac. Cette fraction de l'effluent a été collectée, débarrassée de ses sels (citrate de sodium), puis soumise à une hydrolyse alcaline (*) et enfin, après élimination de la soude (**), étudiée par électrophorèse sur papier.

La figure 27 montre qu'au cours de l'hydrolyse alcaline, il y a eu libération, à côté d'une certaine quantité de lysine, de divers composés donnant une réaction positive à la ninhydrine. Cet électrophorégramme est superposable à celui que l'on obtient en chauffant, en présence de soude 2N dans les mêmes conditions, de la lysine, qui donne naissance à divers produits de dégradation alcaline.

Ces expériences semblent donc démontrer que les restes de DOPA-quinone, formés lors de l'oxydation des restes de tyrosine de la ribonucléase performique, se condensent avec des restes de lysine existant dans d'autres chaînes protéiques. Ceci n'élimine pas pour autant la possibilité d'autres types de condensations : soit avec des restes de lysine existant dans la même chaîne, soit même avec des acides aminés autres que la lysine. Toutefois, cette dernière étant le seul acide aminé possédant un groupement réactif sur sa chaîne latérale dont le taux soit abaissé dans l'hydrolysat chlorhydrique de la protéine oxydée, on doit admettre que les structures qui résulteraient de la condensation de restes de DOPA-quinone avec des restes d'acides aminés autres que la lysine seraient détruites au cours

(*) L'élimination du citrate de sodium a été réalisée par passage sur une colonne (12 × 2 cm) de résine échangeuse d'ions (Dowex 50 × 4). L'effluent collecté (20 ml environ), après concentration sous vide jusqu'à un volume de 7 à 8 ml, a été déposé à la surface de la résine. Celle-ci a été lavée avec de l'eau, jusqu'à ce que l'effluent ait atteint un pH de 4 environ, éluée par NH_4OH 1 N. L'éluat obtenu a été évaporé sous vide sur P_2O_5. Le résidu sec (qui contenait une petite quantité de soude) a ensuite été traité par NaOH 2 N pendant 2 à 5 h à 110° en tube scellé sous vide.

(**) ... par passage du milieu d'hydrolyse sur colonne de Dowex 1. Après dépôt du milieu à la surface de la résine, celle-ci a été lavée avec de l'eau, jusqu'à ce que l'effluent ait atteint un pH de 8 à 9, puis éluée par CH_3COOH 1 N. L'éluat, après dessication sous vide a laissé un résidu sec qui, repris par un petit volume d'eau, a été soumis à l'électrophorèse.

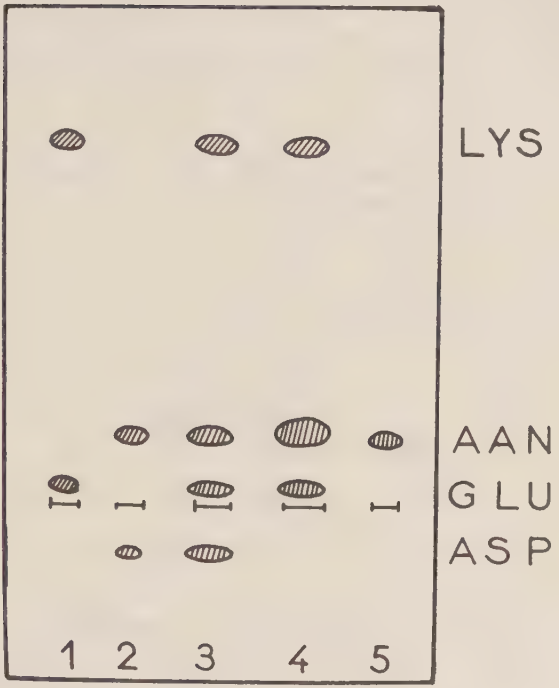


Fig. n° 27. — Schéma de l'électrophorèse sur papier du composé élué avec l'ammoniac, au cours de la séparation par chromatographie sur résine « chromobeads » Technicon, des constituants d'un hydrolysat chlorhydrique de ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ.

Ce composé (piste 4) a été soumis à une hydrolyse de 5 heures par NaOH 2 N à 110° C, en tube scellé sous vide. La piste 3 correspond aux produits obtenus par la dégradation de la lysine en milieu alcalin, dans les mêmes conditions (0,5 mg dans 1 ml de NaOH 2 N). Les pistes 1, 2 et 5 correspondent à des acides aminés témoins (respectivement Glu et Lys, Asp et Ser, Leu et Lys).

Electrophorèse sur papier Whatman 3 MM pendant 1 heure ; 2 500 volts pour 57 cm, 3 mA par cm. Révélation par la ninhydrine (0.25 p. cent dans l'acétone).

de l'hydrolyse chlorhydrique, avec régénération des constituants entrant dans la combinaison.

Certains arguments en faveur de cette possibilité peuvent être tirés de la comparaison des spectres d'absorption dans l'ultraviolet : — d'une part du composé isolé au niveau du pic d'ammoniac, après chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions d'un hydrolysat chlorhydrique de ribonucléase performique oxydée, — et d'autre part de la fraction

de cette même protéine oxydée ayant résisté à l'action de divers enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine et enzyme P de *Streptomyces griseus*, explications données en légende de la figure 28).

La figure 28 montre que ces spectres sont notablement différents.

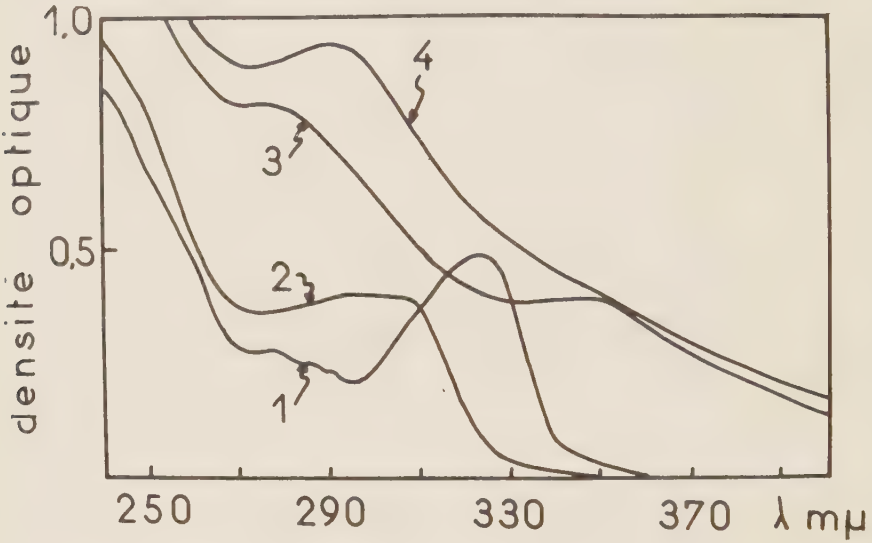


Fig. n° 28. — Spectres d'absorption en lumière ultraviolette du composé formé au cours de l'oxydation de la ribonucléase performique par la PPO-KZ et résultant vraisemblablement de la condensation de résidus de DOPA-quinone et de lysine.

A) Composé obtenu après hydrolyse de la protéine oxydée par HCl 6 N pendant 24 heures à 110° C et séparation sur colonne de résine échangeuse d'ions : collection de l'effluent correspondant au pic de NH_3, élimination des sels (voir texte) et enregistrement du spectre (1) en solution dans l'eau, (2) en solution dans NaOH 0,1 N.

B) La solution soumise à l'analyse spectrophotométrique (3 : dans l'eau ; 4 : dans NaOH 0,1 N) a été obtenue par les opérations suivantes : séparation par chromato-électrophorèse de la tache pigmentée (de Rf = 0 en butanol-acétique et trainant en électrophorèse) provenant d'une digestion par la trypsine et la chymotrypsine de ribonucléase performique oxydée par la PPO-KZ (cf. fig. n° 26) : élution de cette tache par l'eau et nouvelle digestion par l'enzyme P de streptomyces griseus (124) suivie de chromato-électrophorèse. La tache pigmentée restant au niveau de la zone de dépôt et présentant les mêmes caractéristiques que celle obtenue lors de la précédente chromato-électrophorèse est également éluée par l'eau. La solution qui en résulte constitue le produit dont le spectre est reporté.

On peut penser que dans le second cas, les protéases utilisées ont vu leur action entravée en certains points de la molécule soit du fait de la disparition d'une partie de leurs sites d'action électifs, soit par gêne stérique, soit enfin par suite de

la formation de nouvelles liaisons entre restes d'acides aminés, liaisons sur lesquelles elles sont incapables d'agir. Il en résulte la persistance après protéolyse d'une fraction de la molécule contenant encore qualitativement la plupart des acides aminés (mis en évidence après hydrolyse chlorhydrique) et donc de poids moléculaire assez important. Cette partie de la molécule présente le même spectre d'absorption dans l'ultraviolet (*) et possède les mêmes caractères de pigmentation et de fluorescence en lumière ultraviolette que la molécule entière de protéine oxydée. On peut donc penser qu'elle contient encore les structures néoformées responsables de ces propriétés.

Au contraire, l'hydrolyse chlorhydrique, beaucoup plus brutale, conduit à la destruction à peu près totale de ces structures (libération de la quasi-totalité des acides aminés sur le plan quantitatif) et paraît ne laisser subsister que certains composés résultant de la condensation de restes de DOPA-quinone avec des restes de lysine.

DISCUSSION

De nombreux travaux antérieurs (exposés et références dans 5 et 27) ont démontré que les quinones sont susceptibles de réagir très facilement : 1) avec des groupements aminés, y compris les groupements $—NH_2$ des aminoacides, la réaction pouvant donner lieu ou à la formation de quinone-imines, ou à des substitutions nucléaires et 2) avec des groupements thiols, la réaction étant alors orientée le plus fréquemment vers la substitution.

De telles réactions entre quinones et acides aminés peuvent faire intervenir soit des paraquinones, soit des orthoquinones, substituées ou non (5, 27) prenant naissance au cours de l'oxydation par la polyphénoloxydase de monophénols ou d'orthodiphénols.

Toutefois, la DOPA-quinone libre (de même d'ailleurs que les autres intermédiaires orthoquinoniques apparaissant au cours de la mélanogénèse) ne paraît pas capable de réagir avec des groupements aminés appartenant à des composés autres que les amines aromatiques (a. para-aminobenzoïque par exemple). En outre, les substitutions nucléaires engendrées par la réaction d'amines ou de thiols sur les orthoquinones aboutissent, par suite d'un phénomène de réduction concomitant, à la formation de dérivés N— ou S— orthodiphénoliques qui ne

(*) ... mis à part un léger affaiblissement relatif de la bande d'absorption de λ max. = 350 $m\mu$.

sont plus oxydables par la polyphénoloxydase. On peut cependant penser que les restes de DOPA-quinone inclus dans une chaîne polypeptidique présentent une réactivité différente et sont capables de se condenser avec des groupements aminés d'amino-acides, en particulier avec les groupements ε—NH_2 de la lysine, selon des mécanismes qui pourraient être ceux décrits dans la figure 29.

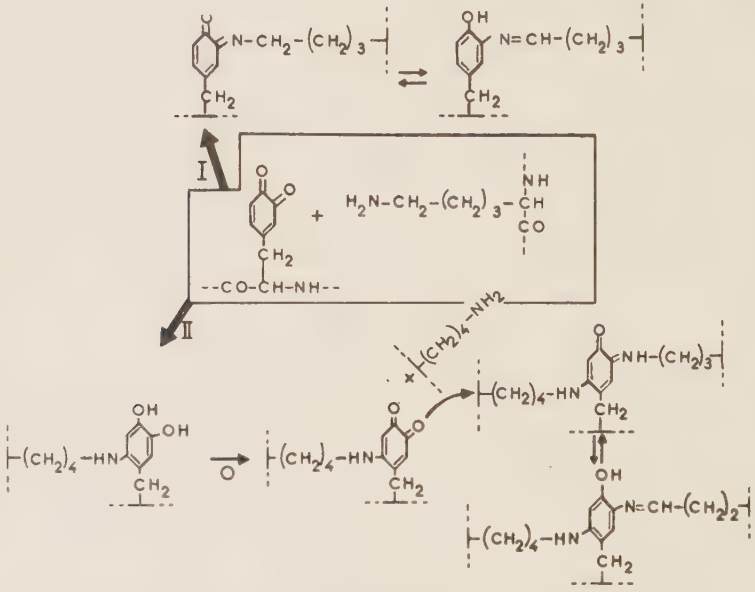


FIG. N° 29

De tels mécanismes permettraient d'expliquer : 1) la polymérisation, les restes de DOPA-quinone d'une chaîne polypeptidique se condensant par l'intermédiaire de liaisons covalentes avec les groupements ε—NH_2 de restes de lysine d'autres chaînes et 2) certaines propriétés spectrophotométriques de la protéine oxydée, en particulier les modifications du spectre d'absorption dans l'ultraviolet selon le pH, un groupement phénolique ionisable persistant sur le noyau aromatique.

En outre, le mécanisme II, qui comporte une étape oxydative, rendrait compte de la consommation d'oxygène supérieure en fin d'incubation à une mole par reste de tyrosine oxydé.

Indépendamment des phénomènes — qui paraissent différents — de mélanisation et d'association des mélanines naturelles avec les protéines (129-134), certaines propriétés des protéines oxydées (pigmentation, polymérisation, participation

des groupements quinoniques à la réaction) évoquent ceux de la « sclérotisation », du tannage *in vivo* des protéines par des quinones. Il s'agit là de mécanismes assez généraux (téguments, yeux, cheveux, plumes...) mais qui se produisent avec une intensité particulière dans le cas des cuticules d'insectes (5, 41, 135-139). Le mécanisme de ces réactions dont le résultat est une pigmentation, une insolubilisation et un durcissement des protéines qui constitueront ultérieurement l'exocuticule, n'est pas encore actuellement connu de façon certaine. Il semble bien, toutefois, qu'elles fassent intervenir la condensation de groupements aminés existant dans les protéines (groupements aminés terminaux des chaînes protéiques et groupements ε—NH_2 de la lysine, en particulier) avec les produits de l'oxydation, catalysée par la polyphénoloxydase (quinones), de divers phénols existant à l'état libre dans la cuticule.

Pour Dennell (140-142) des quinones du genre parabenzoquinone interviendraient dans de telles condensations, formant ainsi un « pont » entre des chaînes protéiques différentes. Cependant la majorité des auteurs s'accordent à reconnaître une place prépondérante aux orthoquinones (137, 143, 146), principalement à celles provenant de la tyrosine ou de ses dérivés dans lesquels la chaîne latérale a été modifiée. Une telle conception est basée sur les constatations suivantes : 1) parmi les phénols identifiés et isolés à partir des cuticules d'insectes, on trouve, outre la tyrosine et la DOPA, l'acide 3:4-dihydroxyphénylactique, l'acide 3:4-dihydroxyphénylacétique et l'acide 3:4-dihydroxybenzoïque (137) ; 2) la concentration en tyrosine libre dans le sang s'élève lorsqu'approche la période de pupation et 3) le taux de ces divers composés diminue brutalement à la fois dans le sang et au niveau de la cuticule lorsque débutent les réactions de « sclérotisation » (147-149).

L'oxydation *in vitro* des protéines par la polyphénoloxydase paraît présenter un certain nombre d'analogies avec ces phénomènes de tannage des protéines cuticulaires *in vivo*. Les résultats obtenus suggèrent que, dans le cas de la sclérotisation, les réactions de condensation faisant intervenir des orthoquinones libres dérivant de la tyrosine, pourraient également impliquer des restes de DOPA-quinone formés au sein de la protéine par oxydation de restes de tyrosine. Une telle possibilité a déjà été évoquée par Hackman (145). L'oxydation de protéines de structure connue pourrait alors servir de modèle pour la compréhension du mécanisme chimique des réactions auxquelles donne lieu le tannage *in vivo* de protéines difficiles à extraire et à purifier, et par conséquent, de composition et de structure mal connues.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'action sur divers acides aminés, peptides et protéines d'une polyphénoloxydase de champignon très pure et de haute activité spécifique, et nous avons tiré de cette étude certaines conclusions concernant tant le mécanisme d'action de l'enzyme que les modifications apportées aux substrats après oxydation.

I. — DANS LA PREMIERE PARTIE, nous avons montré que les premières molécules de DOPA peuvent se former au sein d'un milieu d'incubation de L-tyrosine, par un mécanisme faisant intervenir les constituants de l'enzyme vraisemblablement en tant qu'agents d' « hydroxylation non spécifique », sans mettre en jeu leurs propriétés enzymatiques. Un tel mécanisme permet de comprendre l'initiation de la réaction d'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase, selon la théorie de l'orthoquinone.

De plus, l'étude chromatographique des premiers stades de l'oxydation par l'enzyme, en présence d'un excès d'acide ascorbique, de la L-tyrosine et de peptides contenant cet acide aminé, a permis de démontrer que la formation de la DOPA-quinone constitue une étape obligatoire et univoque de la réaction. Les résidus de DOPA-quinone sont stabilisés lorsqu'ils sont inclus dans une chaîne peptidique.

Il a été montré également que l'oxydation de divers substrats monophénoliques par la polyphénoloxydase, toujours en présence d'un excès d'acide ascorbique, permet d'obtenir la transformation quantitative de ces substrats en leurs dérivés orthodihydroxyphénoliques. Les conditions de cette transformation ont été précisées, en fonction des substrats utilisés et de certains facteurs intervenant dans la réaction.

Un composé non indolique, dérivant directement de l'oxydation de la DOPA-quinone, a été mis en évidence au cours de l'oxydation de la L-tyrosine et de la L-DOPA ; il pourrait constituer le premier terme de la séquence des réactions conduisant à la formation des mélanines. Certaines de ses propriétés ont été décrites.

Enfin, différents problèmes concernant le mécanisme d'action de l'enzyme en présence d'acide ascorbique, ont été évoqués et discutés.

II. — DANS LA DEUXIEME PARTIE, l'étude de l'action de la polyphénoloxydase sur des protéines natives et homogènes vis-à-vis de divers tests a permis de confirmer que certaines d'entre elles (ribonucléase, lot 574-5, α-lactalbumine lot II) sont oxydées par cet enzyme, alors que d'autres (différents lots de ribonucléase, lysozyme, insuline) ne subissent aucune modification. Un certain nombre de preuves chimiques démontrant que les restes de tyrosine des protéines sont impliqués dans cette oxydation ont également été apportées.

La caractérisation et le dosage de la DOPA dans les protéines oxydées en présence d'acide ascorbique permettent de conclure que, comme dans le cas de la tyrosine libre ou de peptides de tyrosine, l'oxydation par l'enzyme des restes de tyrosine à l'intérieur d'une molécule protéique conduit à la formation de restes de DOPA-quinone.

En outre, l'action sur l'oxydabilité des protéines de divers agents dénaturants et de différents traitements visant à détruire les structures secondaire et tertiaire a permis de préciser quelques-uns des facteurs gouvernant le caractère accessible ou non par l'enzyme des restes de tyrosine de ces protéines. Ce caractère constitue un test très sensible pour la mise en évidence du degré de liberté des groupements phénoliques au sein de la protéine, et son intérêt dans le cadre de l'étude de la structure tertiaire des protéines et de leur configuration spatiale a été évoqué.

III. — DANS LA TROISIEME PARTIE du travail, certaines propriétés chimiques et physico-chimiques de protéines natives ou dénaturées (α-lactalbumine, ribonucléase performique) dans lesquelles tout ou partie des restes de tyrosine ont été oxydés en restes de DOPA (DOPA-protéines) ont été décrites.

En l'absence d'acide ascorbique, la ribonucléase performique soumise à l'action de la polyphénoloxydase se pigmente et une polymérisation de la molécule peut être mise en évidence. Il a été montré que les liaisons unissant les monomères sont des liaisons covalentes, formées aux dépens de résidus de DOPA-quinone et de fonctions ε-aminées de résidus de lysine. Diverses considérations ont amené à formuler certaines hypothèses concernant la structure de ces polymères.

Enfin, la signification physiologique de ces observations a été discutée, notamment dans ses rapports possibles avec les phénomènes de «sclérotisation» des protéines qui se manifestent dans les cuticules d'insectes au moment de la pupation. L'oxydation *in vitro* de certaines protéines pourrait servir de « modèle simplifié » pour l'étude des réactions plus complexes se déroulant *in vivo*.

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

DOPA	: 3:4 dihydroxyphényl-L-alanine.
DOPA-quinone	: 3:4 dihydroxyphényl-L-alanine-quinone.
mg, μg	: milligramme, microgramme.
ml, μl	: millilitre, microlitre.
mC, μC	: millicurie, microcurie.
PPO - KZ	: polyphénoloxydase de champignon préparée par KERTESZ et ZITO.
PPO - L	: polyphénoloxydase provenant des Laboratoires LIGHT.
PPO - W	: polyphénoloxydase provenant des Laboratoires WORTHINGTON.
Ribonucléase performique	: ribonucléase oxydée par l'acide performique.
DOPA-protéines	: protéines dans lesquelles tout ou partie des restes de tyrosine ont été transformés en restes de DOPA.
E.D.T.A.	: acide éthylène-diamine tetra-acétique (sel de sodium).
λ	: longueur d'onde.
λ max., λ min.	: longueur d'onde correspondant au maximum ou au minimum d'absorption d'un composé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pour les périodiques, le premier chiffre indiqué (en italique) correspond au numéro du volume ; le second (entre parenthèses) à l'année de la publication et le troisième au numéro de la première page de l'article cité.

1 — A.B. LERNER et T.B. FITZPATRICK. — *Physiol. rev., 30* (1950), 91.
2 — C.R. DAWSON et W.B. TARPLEY. — « *The enzymes* » Sumner et Myrback ed. *Acad. Press.* New York, 1951, t. *II*, p. 454.
3 — A.B. LERNER. — *Advances in Enzymol. Interscience* Publishers Inc., New York, *14* (1953), 73.
4 — T.P. SINGER et E.B. KEARNEY. — In « *The proteins* », Neurath et Bailey ed., *Acad. Press.* New York, 1954, t. *II*, p. 135.
5 — H.S. MASON. — *Advances in Enzymol. Interscience* Publishers Inc. New York, *16* (1955), 105.
6 — P. GONNARD. — *Exposés ann. biochim. Méd.* Masson éd., 1955, *17*, 287.
7 — H.S. MASON. — *Advances in Enzymol. Interscience* Publishers Inc. New York, *19* (1957), 79.
8 — K.T. YASUNOBU. — In « *Pigment cell biology* », Gordon ed. *Acad. Press.* New York, 1959, p. 583.
9 — D. KERTESZ et R. ZITO. — In Hayaishi. « *The oxygenases* », *Acad. Press.* New York, 1962, p. 307.
10 — G. BERTRAND. — *Bull. Mus. Hist. Nat., 2* (1896), 206.
11 — E. KUBOWITZ. — *Biochem. Z., 299* (1938), 32.
12 — D. KEILIN et T. MANN. — *Proc. Roy. Soc. B., 125* (1938), 187.
13 — M.F. MALLETTE, S. LEWIS, S.R. AMES, J.M. NELSON et C.R. DAWSON. — *Arch. biochem., 16* (1948), 283.
14 — N.H. HOROWITZ et S. SHEN. — *J. biol. chem., 197* (1952), 513.
15 — N.H. HOROWITZ et M. FLING. — *Genetics, 38* (1953), 360.
16 — A.B. LERNER, T.B. FITZPATRICK, E. CALKINS et W.H. SUMMERSON. — *J. biol. chem., 178* (1949), 185.
17 — F.C. BROWN et D.N. WARD. — *J. biol. chem., 233* (1958), 77.
18 — F.C. BROWN et D.N. WARD. — *Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 100* (1959), 701.
19 — F.C. BROWN, D.N. WARD et A.C. GRIFFIN. — In « *Pigment cell biology* », Gordon ed. *Acad. Press.* New York, 1959, p. 525.
20 — D. KERTESZ. — *Bull. Soc. chim. biol., 32* (1950), 587.
21 — D. KERTESZ et R. ZITO. — *Nature, 179* (1957), 1017.
22 — D. KERTESZ et R. ZITO. — *Compt. rend. Soc. biol., 151* (1957), 1078.
23 — H.S. RAPER. — *Biochem. J., 21* (1927), 89.
24 — H.S. RAPER. — *Physiol. Rev., 8* (1928), 245.
25 — H.S. RAPER. — *Ergeb. Enzyforsch., 1* (1932), 270.
26 — W.C. EVANS et H.S. RAPER. — *Biochem. J., 31* (1937), 2162.
27 — H.S. MASON. — In « *Pigment cell biology* », Gordon ed. *Acad. Press.* New York, 1959, p. 569.
28 — D. KERTESZ. — *Biophys. Biochim. Acta, 9* (1952), 170.
29 — D. KERTESZ. — *Bull. Soc. chim. biol., 32* (1950), 583 ; *35* (1953), 993.
30 — *a*) E.G. BALL et T.T. TCHEN. — *J. biol. chem., 102* (1933), 691, cités d'après :
b) W.D. WOSILAIT, A. NASON et A.J. TERREL. — *J. Biol. chem., 206* (1959), 1407.
31 — A. KODJA et S. BOUCHILLOUX. — *Compt. rend. Soc. biol., 153* (1959), 1407.
32 — K.T. YASUNOBU, E.W. PETERSON et H.S. MASON. — *J. biol. chem., 234* (1959), 3291.

33 — M.H. Adams et J.M. Nelson. — *J. Am. Chem. Soc., 60* (1938), 2474.
34 — W.H. Miller et C.R. Dawson. — *J. Am. Chem. Soc., 63* (1941), 3375.
35 — F.G. Smith et E. Stotz. — *J. biol. chem., 179* (1949), 865.
36 — M.P. el Bayoumi et E. Frieden. — *J. Am. Chem. Soc., 79* (1957), 4854.
37 — L.L. Ingraham — *Anal. Chem., 28* (1956), 1177.
38 — Onslow et Robinson. — *Biochem. J., 22* (1928), 1327.
39 — D. Kertesz. — *Enzymologia, 12* (1948), 254.
40 — D. Kertesz. — *Nature, 165* (1950), 523 ; *168* (1951), 697.
41 — H.S. Mason. — *Nature, 177* (1956), 79.
42 — H.S. Mason, W.L. Fowlks et E.W. Peterson. — *J. Am. Chem. Soc., 77* (1955), 2914.
43 — D. Kertesz et O. Azzoparodi. — *Bull. Soc. Chim. biol., 42* (1960), 945.
44 — L.E. Arnow. — *J. biol. chem., 120* (1937), 151.
45 — J. Rowbottom. — *J. biol. chem., 212* (1955), 877.
46 — B. Robert, R.-O. Prudhomme et P. Grabar. — *Bull. Soc. Chim. Biol., 37* (1955), 897.
47 — M.S. Raper. — *Biochem. J., 26* (1932), 2000.
48 — J.H. Baxendale. — *Advances in catalysis, 4* (1952), 31.
49 — Cl. Nofre, L. Welin, J. Parnet et A. Cier. — *Bull. Soc. Chim. biol., 43* (1961), 1237.
50 — A. Cier et C. Nofre. — *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1959), 1523.
51 — S. Udenfriend, T.C. Clark, J. Axelrod et B.B. Brodie. — *J. biol. chem., 208* (1954), 731.
52 — B.B. Brodie, J. Axelrod, P.A. Shore et S. Udenfriend. — *J. biol. chem., 208* (1954), 741.
53 — L.E. Dalgliesh. — *Arch. biochem. biophys., 58* (1955), 214.
54 — S. Lissitzky et M. Roques. — *Bull. Soc. Chim. biol., 39* (1957), 521.
55 — S. Lissitzky, M. Roques et M.T. Benevent. — *Compt. rend. soc. biol., 151* (1957), 352.
56 — R. Breslow et N. Lukens. — *J. biol. chem., 235* (1960), 292.
57 — C. Nofre, A. Cier et A. Lefier. — *Bull. Soc. chim. Fr.* (1961), 530.
58 — L. Massart et R. Vercauteren. — *Ann. Rev. Biochem., 28* (1959), 527.
59 — J. Weiss. — *Experientia, 9* (1953), 61.
60 — S. Udenfriend et J.R. Cooper. — *J. biol. chem., 194* (1952), 203.
61 — R.M. Acheson et C.M. Hazelwood. — *Biochim. Biophys. Acta, 42* (1960), 49.
62 — R. Zito et D. Kertesz. — *Biochim. Biophys. Acta, 54* (1961), 197.
63 — I.W. Sizer. — *J. biol. chem., 163* (1946), 145.
64 — I.W. Sizer. — *J. biol. chem., 169* (1947), 303.
65 — I.W. Sizer. — *Science, 108* (1948), 335.
66 — I.W. Sizer et C.O. Brindley. — *J. biol. chem. 185* (1950), 323.
67 — I.W. Sizer et J.F. Fennessey. — *J. biol. chem., 188* (1951), 351.
68 — W.J. Hass, I.W. Sizer et J.R. Loofbourow. — *Biochim. Biophys. Acta, 6* (1951), 589.
69 — I.W. Sizer et P.F. Wagley. — *J. biol. chem., 192* (1951), 213.
70 — I.W. Sizer. — *Advances in Enzymol. Interscience* Publishers Inc. New York, *14* (1953), 129.
71 — P. Edman. — *J. biol. chem., 168* (1947), 167.
72 — D. Kertesz et P. Caselli. — *Bull. Soc. chim. biol., 32* (1950), 583.
73 — D. Kertesz. — *Nature, 165* (1950), 523.
74 — S. Lissitzky, M. T. Benevent et S. Bouchilloux. — *Compt. rend. soc. biol., 151* (1957), 2144.
75 — K.T. Yasunobu et W.B. Dandliker. — *J. biol. chem., 224* (1957), 1065.
76 — K.T. Yasunobu et P.E. Wilcox. — *J. biol. chem., 231* (1958), 309.
77 — E. Frieden, C. Bigelow et M. Ottesen. — *Fed. proc., 18* (1959), n° 907.
78 — S. Lissitzky et M. Rolland et S. Lasry. — *Biochim. Biophys. Acta, 39* (1960), 379.
79 — S. Lissitzky et M. Rolland. — *Biochim. Biophys. Acta, 56* (1962), 95.

80 — N.H. Wood et A.K. Balls. — *J. biol. chem., 213* (1955), 297.
81 — G.H. Hogeboom et M.H. Adams. — *J. biol. chem., 145* (1942), 273.
82 — D. Kertesz. — *Bull. Soc. chim. biol., 33* (1951), 1400.
83 — S.R. Dickman et K. Trupin. — *Arch. biochem. biophys., 82* (1959), 355.
84 — J. Enselme, J.M. Petat et J. Monestier. — *Bull. Soc. chim. biol., 32* (1950), 872.
85 — C.H.W. Hirs. — *J. biol. chem., 219* (1956), 611.
86 — E.A. Barnard et W.D. Stein. — *Biochim. Biophys. Acta, 37* (1960), 371.
87 — P. Jolles et J. Jolles. — *Bull. Soc. chim. biol., 40* (1958), 1933.
88 — L. Gatterman. — *Manuel Pratique de Chimie organique*, Payot, Paris, 1947, p. 272.
89 — J. Robbins. — *Arch. biochem. biophys., 63* (1956), 461.
90 — K.A. Piez et L. Morris. — *Anal. biochem., 1* (1960), 187.
91 — S. Moore, D.H. Spackman et W.H. Stein. — *Anal. chem., 30* (1958), 297.
92 — D.H. Spackman, W.H. Stein et S. Moore. — *Anal. chem., 30* (1958), 411.
93 — M. Rolland, S. Lasry et S. Lissitzky. — *Bull. soc. chim. biol., 42* (1960), 1065.
94 — S. Moore et W.H. Stein. — *J. biol. chem., 192* (1951), 663.
95 — S. Udenfriend et J.S. Cooper. — *J. biol. chem., 196* (1952), 227.
96 — L.E. Arnow. — *J. biol. chem., 118* (1937), 454.
97 — M. Mortreuil et Y. Khouvine. — *Bull. soc. chim. biol., 36* (1954), 425.
98 — E. Kavereau et T. Wieland. — *Nature, 168* (1951), 77.
99 — R. Acher et C. Crocker. — *Biochim. biophys. Acta, 9* (1952), 704.
100 — S.U. Gurnari, U.S. Kumita et M.B. Sahasrabudha. — *Biochim. biophys. Acta, 16* (1955), 553.
101 — G.E. Underwood et F.E. Deatherage. — *Science, 115* (1952), 95.
102 — J.C. Paulson et F.E. Deatherage. — *J. biol. chem., 205* (1953), 909.
103 — J.R. Whitaker et F.E. Deatherage. — *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955), 3360.
104 — A.M. Katz, W.J. Dreyer et C.B. Anfisen. — *J. biol. chem., 234* (1959), 2897.
105 — W.J. Archibald. — *J. Phys. and colloïd chem., 51* (1947), 1204.
106 — S.M. Klainer et G. Kegeles. — *J. phys. chem., 59* (1955), 952.
107 — R.C. Krueger. — *Arch. biochem. biophys., 76* (1958), 87.
108 — B.J. Ludwig et J.M. Nelson. — *J. Am. Chem. Soc., 61* (1939), 2601.
109 — R.C. Krueger. — *J. Am. Chem., soc.*, 72 (1950), 5582.
110 — J. Neumann, G. Lehongre, G. Legrand et J. Lavollay. — *Compt. rend. Acad. Sci., 247* (1958), 1508.
111 — L.P. Kendal. — *Biochem. J., 44* (1949), 442.
112 — S. Senoh, B. Witkop, C.R. Creveling et S. Udenfriend. — *J. Am. Chem. Soc., 81* (1959), 1768.
113 — P. Douzou. — Thèse doct. Sc. phys., Lyon, 1959.
114 — D. Shugar. — *Biochem. J., 52* (1952), 142.
115 — C. Tanford, J.D. Hauenstein et D.G. Rands. — *J. Am. Chem. Soc., 77* (1955), 6409.
116 — M. Sela et C.B. Anfisen. — *Biochim. Biophys. Acta, 24* (1957), 229.
117 — W.F. Harrington et J.A. Schellman. — *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg*, sér. chim., *30* (1956), 21.
118 — H.A. Scheraga. — *Biochim. biophys. Acta, 23* (1957), 196.
119 — O. Blumenfeld et M. Lévy. — *Arch. biochem. biophys., 76* (1958), 97.
120 — C.B. Anfisen. — *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg*, sér. chim., *30* (1956), 13.
121 — M. Sela, C.B. Anfisen et W.F. Harrington. — *Biochim. biophys. Acta, 26* (1957), 502.
122 — H.K. Schachman. — *Methods in Enzymology, Acad. Press.* New York, 1957, vol. 4, p. 32.

123 — A. Rothen. — *J. Gen. Physiol.*, *24* (1940-41), 203.
124 — M. Nomoto et Y. Narahashi. — *J. biochem.* (Japan), *46* (1959), 653 et 839.
125 — H. Jackson et L.P. Kendal. — *Biochem. J.*, *44* (1949), 477.
126 — H.S. Mason. — *Nature*, *175* (1955), 771.
127 — H.S. Mason et E.W. Peterson. — *J. biol. chem.*, *212* (1955), 485.
128 — S. Bouchilloux et A. Kodja. — *C.R. Acad. Sciences*, *251* (1960), 1920.
129 — J.P. Greenstein, F.C. Turner et W.V. Jenrette. — *J. Nat. Cancer Inst.*, *1* (1940), 337.
130 — J.A. Serra. — *Nature*, *157* (1946), 771.
131 — J.L. Stoves. — *Research* (London), *6* (1953), 298.
132 — J. Laxer et C.S. Whewell. — *Chem. and Ind.* (1954), 127.
133 — W.D. Stein. — *Nature*, *175* (1955), 256.
134 — P. Vohra et F.H. Kratzer. — *Proc. Soc. Expl. Biol. Méd*, *100* (1959), 837.
135 — S.R.A. Malek. — *Nature*, *180* (1957), 237.
136 — B.M. Jones et W. Sinclair. — *Nature*, *181* (1958), 926.
137 — R.H. Hackman. — *Proc. IV^e intern. Congress of biochem. Vienne, 1958*, Pergamon Press, London, 1959 ; vol. *12*, p. 48.
138 — C.H. Brown. — *Nature*, *165* (1950), 275.
139 — S. Fuzeau. — Thèse Doct. Sciences Nat., Paris, 1960.
140 — R. Dennell. — *Nature*, *180* (1957), 1070.
141 — R. Dennell. — *Proc. Roy. Soc. B.*, *148* (1958), 270.
142 — R. Dennell. — *Biol. Revs*, *33* (1958), 178.
143 — M.G.M. Pryor. — *Proc. Roy. Soc. B.*, *128* (1940), 378.
144 — R.H. Hackman, M.G.M. Pryor et A.R. Todd. — *Biochem. J.*, *43* (1948), 474.
145 — R.H. Hackman. — *Biochem. J.*, *54* (1953), 362, 367 et 371.
146 — P. Karlson. — *Z. f. physiol. chem.*, *318* (1960), 194.
147 — G. Fraenkel et K.M. Rudall. — *Proc. Roy. Soc. B.*, *134* (1947), 111.
148 — R.H. Hackman. — *Australian J. biol. Sci.*, *9* (1956), 400.
149 — R. Dennell. — *Proc. Roy. Soc. B.*, *136* (1947), 79.
150 — V. Massey et B.S. Hartley. — *Biochim. Biophys. Acta*, *21* (1956), 361.
151 — G.E. Perlmann. — *J. Am. Chem. Soc.*, *74* (1952), 6308.
152 — G.E. Perlmann. — *Advances in Protein Chem.*, *10* (1955), 1 ; *J. Gen. Physiol.*, *41* (1958), 441.
153 — A.E. Mirsky et L. Pauling. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 22 (1936), 439.
154 — A.L. Berger et K. Linderström-Lang. — *Arch. Biochem. Biophys.*, *69* (1957), 106.
155 — K. Linderström-Lang. — « *The Enzymes* », Boyer, Lardy et Myrbäck ed., *Acad. Press Inc.* New York, 1959, vol. I, p. 443.
156 — P. Desnuelle. — *Cah. Phys.*, *14* (1960), 482.
157 — H.A. Sheraga. — « *Protein Structure* », *Acad. Press.* New York, 1961, p. 78.
158 — G.R. Stark, W.H. Stein et S. Moore. — *J. Biol. Chem.*, *236* (1961), 436.
159 — J.A. Rupley et H.A. Sheraga. — *Biochem. Biophys. Acta*, *44* (1960), 191.
160 — H.A. Sheraga. — « *Protein Structure* », *Acad. Press.* New York (1961), 129.
161 — J.L. Crammer et A. Neuberger. — *Biochem. J.*, *37* (1943), 302.
162 — A. Hvidt et K. Linderström-Lang. — *Biochim. Biophys. Acta*, *14* (1954), 574.
163 — I.M. Krause et K. Linderström-Lang. — *Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg, sér. chim.*, *29* (1955), 367.
164 — R.E. Richards et H.W. Thompson. — *J. Chem. Soc.* (1947), p. 1248 (cités d'après réf. 156, 159, p. 209).
165 — E.J. Williams et J.F. Foster. — *J. Am. Chem. Soc.*, *81* (1959), 865.
166 — D. Harker — Indication donnée dans la discussion d'une communication présentée par H.A. Sheraga : *Brookhaven symposia in Biol.*, *13* (1960), 71.

167 — A. Hvidt. — *Biochim. Biophys. Acta, 18* (1955), 306.
168 — H.J. Sage et S.J. Singer. — *Biochim. Biophys. Acta, 29* (1958), 663.
169 — C.Y. Cha et H.A. Sheraga. — *J. Am. Chem. Soc., 82* (1960), 67.
170 — C.Y. Cha et H.A. Sheraga. — *Biochem. Biophys. Research. Com., 5* (1961), 67.
171 — H. Fraenkel-Conrat. — In « *The Enzymes* », Boyer, Lardy et Myrbäck ed., *Acad. Press Inc.* New York 1959, vol. I, p. 603.
172 — F.M. Richards. — *Fed. Proc., 17* (1958), 296.
173 — F.M. Richards et P.J. Withayathil. — *J. Biol. Chem., 234* (1959), 1459.
174 — C.L. Schildkraut et H.A. Sheraga. — *J. Am. Chem. Soc., 82* (1960), 58.
175 — H.A. Sheraga. — *J. Am. Chem. Soc., 82* (1960), 3847.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION ET RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE : 13

I. — *Propriétés et mécanisme d'action de la polyphénol-oxydase* 13

A) Sources et purification 14
B) Produits formés 15
C) Mécanisme d'action 16

1) Oxydation des orthodihydroxyphénols 16
2) Oxydation des monohydroxyphénols 17
3) Action de la polyphénoloxydase en présence de réducteurs 21

a) Phénomènes observés 21
b) Les systèmes d'hydroxylation non spécifique . 21
c) Discussion 24

D) Conclusion 25

I. — *Oxydation des protéines par la polyphénoloxydase* 25

Exposé des travaux antérieurs 25

Aperçu général sur la structure des protéines 28

A) Différents types de liaisons rencontrées dans les protéines 28
protéines :
— Liaisons covalentes 28
— Liaisons non covalentes 28

B) Participation de ces liaisons à la structure des protéines 29

C) Influence de la structure tertiaire sur la réactivité des protéines 31
1) Réactivité des groupements fonctionnels des acides aminés. Ionisation 31
2) Liaison de petites molécules ou d'ions aux protéines 33
3) Stabilisation des liaisons covalentes 34
4) Agrégation des molécules protéiques 34
5) Dénaturation 35

D) Méthodes d'étude de la structure tertiaire des protéines 36
1) Réactivité chimique des groupements fonctionnels 36
2) Ionisation 36
3) Mesure du pouvoir rotatoire 37
4) Echange deutérium-hydrogène 37
5) Spectrographie infrarouge 38
6) Spectrophotométrie en lumière ultraviolette 39

E) Application de ces méthodes à l'étude de la structure de la ribonucléase 40

OBJET ET INTERET DU TRAVAIL 43

RECHERCHES PERSONNELLES 45

MATÉRIEL ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES 47

I. — *Matériel et produits chimiques* 47

A) Enzymes 47
B) Substrats 50
C) Réactifs 52

II. — *Techniques expérimentales* 53

A) Incubations et mesures de la consommation d'oxygène 53
B) Dialyse 54
C) Spectrophotométrie 54
D) Electrophorèse sur papier 55
E) Analyse de la composition en acides aminés des protéines 55
F) Séparation et dosage de la tyrosine et de la DOPA .. 56

1) Séparation par chromatographie sur colonne ... 56
2) Dosage 59

a) Spectrophotométrique 59
b) Colorimétrique 60

G) Chromatographie sur papier 62
H) Hydrolyse des protéines 63
I) Chromato-électrophorèse 67
J) Ultracentrifugation 70

PREMIERE PARTIE. — OXYDATION DE LA TYROSINE ET DE PEPTIDES LA CONTENANT EN L'ABSENCE ET EN PRESENCE D'ACIDE ASCORBIQUE 75

Objet de l'étude 75

Résultats 76

I. — *Hydroxylation de la tyrosine par un système non enzymatique faisant intervenir les constituants de la polyphénoloxydase* 76

II. — *Influence de l'acide ascorbique sur la composition des milieux au cours de l'oxydation de la tyrosine et de peptides la contenant* 78

III. — *Facteurs influençant l'apparition de la coloration jaune dans le milieu d'incubation* 82

IV. — *Influence de la concentration en acide ascorbique sur la vitesse de transformation de la tyrosine en DOPA-quinone* 83

V. — *Oxydation enzymatique quantitative d'un monohydroxyphénol en orthodihydroxyphénol* 86

Discussion 89

DEUXIEME PARTIE. — OXYDATION DES RESTES DE TYROSINE DES PROTEINES.

Objet de l'étude 97

Résultats 97

I. — *Action de la polyphénoloxydase sur certaines protéines natives : ribonucléase, α-lactalbumine, lysozyme et insuline* 97

II. — *Action de la polyphénoloxydase sur des protéines à structure modifiée : ribonucléase performique, ribonucléase dénaturée, lysozyme réduit et lysozyme dénaturé* . 101

III. — *Action de la polyphénoloxydase sur les protéines en présence de catéchol : ribonucléase native, ribonucléase performique, α-lactalbumine, lysozyme* 103

IV. — *Action de la polyphénoloxydase sur les protéines en présence d'acide ascorbique : ribonucléase performique, ribonucléase native, α-lactalbumine* 105

V. — *Modifications du spectre d'absorption des protéines en lumière ultraviolette au cours de l'oxydation par la polyphénoloxydase* 108

Discussion 111

TROISIEME PARTIE. — PROPRIETES DES PROTEINES OXYDEES ET DE CERTAINES DOPA-PROTEINES.

Objet de l'étude 117

Résultats 117

I. — *Propriétés de la DOPA-ribonucléase performique* 117

II. — *Propriétés de la ribonucléase performique après oxydation par la polyphénoloxydase* 121

III. — *Polymérisation de la ribonucléase performique après oxydation par la polyphénoloxydase* 123

IV. — *Mécanisme de l'évolution chimique des restes de DOPA-quinone dans les protéines oxydées* 128

Discussion 133

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 137

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES 139

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 141

TABLE DES MATIERES 147

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTÉ

MODIFICATION DES PROTEINES DU MUSCLE UTERIN EN FONCTION DE L'ETAT HORMONAL

VU ET PERMIS D'IMPRIMER,
Le Recteur de l'Académie d'Aix-Marseille :
J. BLACHE.

Aix-en-Provence, le 12 Novembre 1962.

Imprimerie DE MARCHI
22, Ch. St-Jean-du-Désert
MARSEILLE